Elucigene® Male Factor Infertility-Produkte

Gebrauchsanweisung

Produkt	Größe	Bestellnummer
Elucigene Male Factor Infertility	25 Tests	AZFXYB1
Elucigene MFI-Y*plus*	10 Tests	AZFPLBX

IVD Für die In-vitro-Diagnostik

CE

Hersteller:
Elucigene Diagnostics
Citylabs
Nelson Street
Manchester
M13 9NQ

Kontakt für den Vertrieb, Kundendienst und Technischen Support:-
T: +44 (0) 161 669 8122
F: +44 (0) 161 669 8129
E: enquiries@elucigene.com
E: techsupport@elucigene.com

Elucigene Diagnostics ist der Handelsname von Delta Diagnostics (UK) Limited, einem in England und Wales unter der Handelsregisternummer 8696299 eingetragenem Unternehmen.

Elucigene Male Factor Infertility

Bei der Male Factor Infertility-Produktreihe von Elucigene handelt es sich um DNA-basierte Multiplex-Assays für die schnelle Bestimmung des Aneuploidie-Status der Geschlechtschromosomen sowie für den Nachweis und die Charakterisierung der drei häufigsten Klassen der mit männlicher Infertilität assoziierten Mikrodeletionen des Y-Chromosoms. Die Elucigene Male Factor Infertility-Kits sind in den unten aufgeführten Formaten erhältlich. Weitere Informationen über die Kits aus der Male Factor Infertility-Produktreihe finden Sie unter:

http://www.elucigene.com/product-category/reproductive-health/

Verwendungszweck

Male Factor Infertility

Für die routinemäßige quantitative In-vitro-Diagnose der sechs häufigsten, in der Regel mit dem männlichen Infertilitätsfaktor assoziierten Geschlechtschromosom-Aneuploidien (z. B. Klinefelter-Syndrom) und Mikrodeletionen des Y-Chromosoms (AZFa, AZFb und AZFc). Das Kit enthält die STR-Geschlechtschromosom-Marker XHPRT und DXYS218, die Nicht-STR-Marker AMEL, TAF9L sowie SRY-Marker zur Bestimmung des Aneuploidie-Status der Geschlechtschromosomen. Darüber hinaus umfast das Kit die Y-chromosomspezifischen Marker sY84, sY86, sY127, sY134, sY254 und sY255 zum Nachweis von Mikrodeletionen des Y-Chromosoms in den Loci AZFa, AZFb und AZFc. Die im Elucigene Male Factor Infertility-Kit verwendete Methode ist die QF-PCR (quantitative Fluoreszenz-Polymerase-Kettenreaktion). Die Tests sind zur Verwendung mit aus Vollblut (EDTA) extrahierter DNA bestimmt und nicht für die Verwendung mit anderen Probematerialien vorgesehen. Die vorgesehene Zielpopulation sind männliche Patienten mit Verdacht auf Infertilität, bei denen möglicherweise assoziierte Merkmale, wie z. B. verminderte Spermienzahl, vorliegen. Der Test ist für die Verwendung in Verbindung mit anderen Diagnoseverfahren zur Untermauerung oder Widerlegung der vorgeschlagenen klinischen Diagnose vorgesehen. Der Test ist nur zum Gebrauch durch Fachkräfte in einem Molekular- oder Zytogenetiklabor bestimmt.

Male Factor Infertility-Yplus (MFI-Yplus)

Zusatzkit, das weitere Y-Chromosomen-Marker enthält, die in Verbindung mit Male Factor Infertility für die routinemäßige *In-vitro*-Charakterisierung der drei häufigsten mit männlicher Infertilität assoziierten Mikrodeletionen des Y-Chromosoms zu verwenden sind. Das Kit kann für die erweiterte Analyse und Charakterisierung von Mikrodeletionen des Y-Chromosoms verwendet werden, die mittels des Male Factor Infertility-Kits nachgewiesen wurden. Die im Elucigene MFI-Y*plus*-Kit verwendete Methode ist die QF-PCR (quantitative Fluoreszenz-Polymerase-Kettenreaktion). Die Tests sind zur Verwendung mit aus Vollblut (EDTA) extrahierter DNA bestimmt und nicht für die Verwendung mit anderen Probenmaterialien vorgesehen. Die vorgesehene Zielpopulation sind männliche Patienten mit Verdacht auf Infertilität, bei denen ein Test auf Mikrodeletionen des Y-Chromosoms positiv ausgefallen ist. Der Test ist für die Verwendung in Verbindung mit anderen Diagnoseverfahren zur Untermauerung oder Widerlegung der vorgeschlagenen klinischen Diagnose vorgesehen. Der Test ist nur zum Gebrauch durch Fachkräfte in einem Molekular- oder Zytogenetiklabor bestimmt.

Zusammenfassung und Erläuterung

Statistisch treten bei 10–15 % aller Paare Empfängnisschwierigkeiten auf. Annahmen zufolge sind in 50 % der Fälle von den Männern ausgehende Faktoren, wie z. B. niedrige Spermienzahl, die zugrundliegende Ursache. Auch wenn in der Mehrheit der Fälle die Ursachen für die männliche Infertilität unbekannt sind, wurde in Studien nachgewiesen, dass eine Aneuploidie der Geschlechtschromosomen und Mikrodeletionen in speziellen Regionen des Y-Chromosoms eine Rolle spielen können (1).

Das Klinefelter-Syndrom ist die häufigste mit männlicher Infertilität assoziierte Aneuploidie der Geschlechtschromosomen. Die Inzidenz dieses Syndroms unter männlichen Lebendgeburten beträgt zwischen 1:500 und 1:650, und die häufigste Ursache ist eine zusätzliche Kopie des X-Chromosoms (Karyotyp-47, XXY). Bei dieser Veränderung handelt es sich um den in Verbindung mit männlicher Infertilität am häufigsten beobachten Gendefekt. Mikrodeletionen des Y-Chromosoms sind die zweithäufigste genetische Ursache für männliche Infertilität (2), bei der Mikrodeletionen in drei Regionen (AZFa, AZFb, AZFc) auftreten. Diese werden in bis zu 7 % der Oligozoospermie-Fälle (niedrige Spermienzahl) und 13 % der Fälle von nicht-obstruktiver Azoospermie (vollständiges Fehlen von Spermien) nachgewiesen (1). Diese Mikrodeletionen treten aufgrund einer homologen Rekombination der repetitiven Sequenzen in diesen Regionen auf, und die diesen Veränderungen zugrundliegenden exakten molekularen Mechanismen und Rekombinationsereignisse wurden aufgeklärt. Diese Regionen sind in Yq11 des Y-Chromosoms lokalisiert, und während die AZFa-Mikrodeletionsregion klar abtrennbar ist, gibt es eine signifikante Überlappung zwischen den Mikrodeletionen in AZFb und AZFc (Abbildung1).

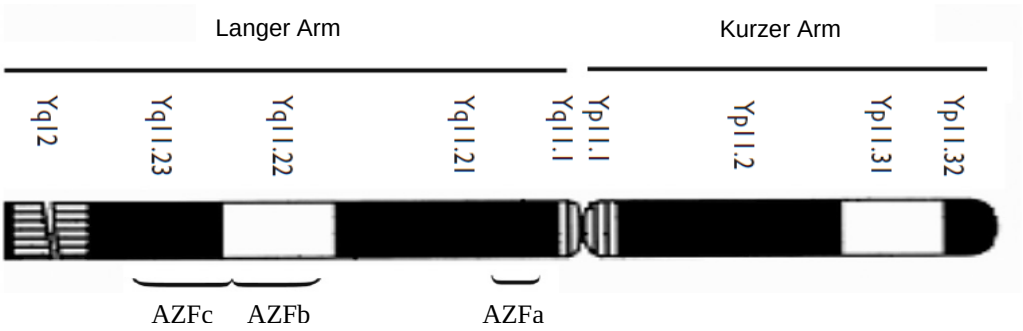


Abbildung 1: Lokalisation der AZFa-, AZFb- und AZFc-Mikrodeletionsregionen auf dem Y-Chromosom (Poongothai et al., 2009).

Die Identifizierung der genetischen Ursachen von männlicher Unfruchtbarkeit kann zu einem effektiveren klinischen Management der Patienten führen. Zum Beispiel weisen Patienten, bei denen eine Mikrodeletion in der AZFc-Region (die häufigste Variante) vorliegt, unterschiedliche Phänotpyen auf (häufig in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund). Doch in der Regel liegt bei diesen Patienten eine Restspermatogenese vor, und die Wahrscheinlichkeit, dass Spermatozoen mittels TESE (Hodenbiopsie zur Spermiengewinnung) gewonnen werden, liegt in diesen Fällen bei 50 %. Von AZFc-Mikrodeletionen betroffene Paare können möglicherweise mithilfe von assistierten Fertilitätstechniken, wie z. B. ICSI (intrazytolasmatische Spermieninjektion) in die Lage versetzt werden, ein Kind zu empfangen. Dies ist anders bei Patienten mit kompletten Mikrodeletionen in der AZFa-, AZFb- und AZFc-Region. In diesen Fällen ist das Gewinnen von funktionsfähigen Spermien unwahrscheinlich (2), obwohl die Wahrscheinlichkeit zunimmt, wenn keine vollständige Deletion vorliegt (siehe Abbildung 2).

Testprinzip

Die bei der Elucigene Male Factor Infertility-Produktreihe verwendete Methode zur Herstellung eines Multiplex-Assays, das eine Aneuploidie des X- und Y-Chromosoms (Male Factor Infertility) sowie Mikrodeletionen des Y-Chromosoms (Male Factor Infertility und MFI-Y*plus*) nachweist, ist die QF-PCR (quantitative Fluoreszenz-Polymerase-Kettenreaktion) (3-7).

(i) Nachweis einer Aneuploidie der Geschlechtschromosomen

Mithilfe der PCR-Amplifikation werden chromosomale Aneuploidien nachgewiesen, wenn mit fluoreszenten Farbstoffen markierte Primer auf hochgradig polymorphe Regionen der DNA-Sequenz, die als „Short Tandem Repeats“ (STRs) bezeichnet werden und auf den interessierenden Chromosomen liegen, abzielen. Jeder Ziel-STR-Marker ist spezifisch für das Chromosom, auf dem er liegt; die Kopienzahl des STR-Markers kann daher zur Diagnose der Kopienzahl des Chromosoms dienen. Es wurden informative STR-Marker ausgewählt, die ein hohes Maß an Heterogenität aufweisen, sodass sich die Kopienzahl leicht bestimmen lässt, wobei zwei Allele eines chromosomspezifischen STR mit der QF-PCR-Technik als zwei Peaks im Verhältnis 1:1 bestimmt werden. Wird ein weiteres STR-Allel beobachtet, entweder als drei Peaks im Verhältnis 1:1:1 oder zwei Peaks im Verhältnis 2:1 oder 1:2, weist dies das Vorliegen einer weiteren Sequenz nach, die wiederum für ein weiteres Chromosom stehen kann.

(ii) Nachweis von Mikrodeletionen des Y-Chromosoms

Im Jahr 2004 haben die Europäische Akademie für Andrologie (EAA) und das europäische Netzwerk für Qualität in der Molekulargenetik (Molecular Genetics Quality Network, EMQN) eine Reihe von Richtlinien zur guten Praxis für Tests auf Mikrodeletionen des Y-Chromosoms vorgeschlagen, bei der für jede Deletionsregion 2 STS-Marker (sequence-tagged site) mittels PCR untersucht werden: AZFa: sY84 und sY86, AZFb: sY127 und sY134 und AZFc: sY254 und Y255 (8). Im Jahr 2014 wurde diese Richtlinien ergänzt und beinhaltet nun eine erweiterte Analyse, die eine weitergehende Charakterisierung und Größenbestimmung der nachgewiesenen Mikrodeletionen in der AZF-Region mittels eines separaten definierten Markersets ermöglicht: AZFa: sY82, sY1182, sY83 und sY88, AZFb: sY105, sY121, sY143 und sY153, AZFc (GR/GR-Subtyp): sY1191 und sY1291 (2). Die weiterführende Charakterisierung/Größenbestimmung von Mikrodeletionen in der AZF-Region ist hilfreich, da sie die Wahrscheinlichkeit erhöht, funktionsfähige Spermien von Patienten mit partiellen Mikrodeletionen zu gewinnen gegenüber Patienten mit einer kompletten Deletion in einer oder mehreren dieser Regionen. Beispielsweise geht die GR/GR-Mikrodeletion, bei der es sich um eine AZFc-Subdeletion handelt, in der Regel mit einem milderen Phänotyp einher als dem bei kompletten Deletionen beobachteten Phänotyp. In der Tat variiert die klinische Signifikanz dieser Subdeletion in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund, und man geht davon aus, dass sie in einigen Populationen einen Subfertilitätsphänotyp verursacht, dagegen jedoch in einigen in der japanischen Population häufig vorkommenden Y-Chromosom-Haplotypen sogar als „fixiert“ gilt, ohne einen Effekt auf die Spermienzahl auszuüben. Mit fluoreszenten Farbstoffen markierte Primer, die spezifisch für flankierende Sequenzen dieser Marker sind, amplifizieren die Wildtyp-Sequenz, und der Verlust des diagnostischen Peaks für den Wildtyp weist auf eine Mikrodeletion dieses STS-Markers hin.

Amplifizierte Produkte der QF-PCR-Technik werden auf einem nach dem Prinzip der Kapillar-Elektrophorese arbeitenden Gen-Analysator quantitativ analysiert, um sowohl die Kopienzahl der analysierten STR-Marker als auch den Deletionsstatus der Y-chromosomalen STR-Marker zu bestimmen.

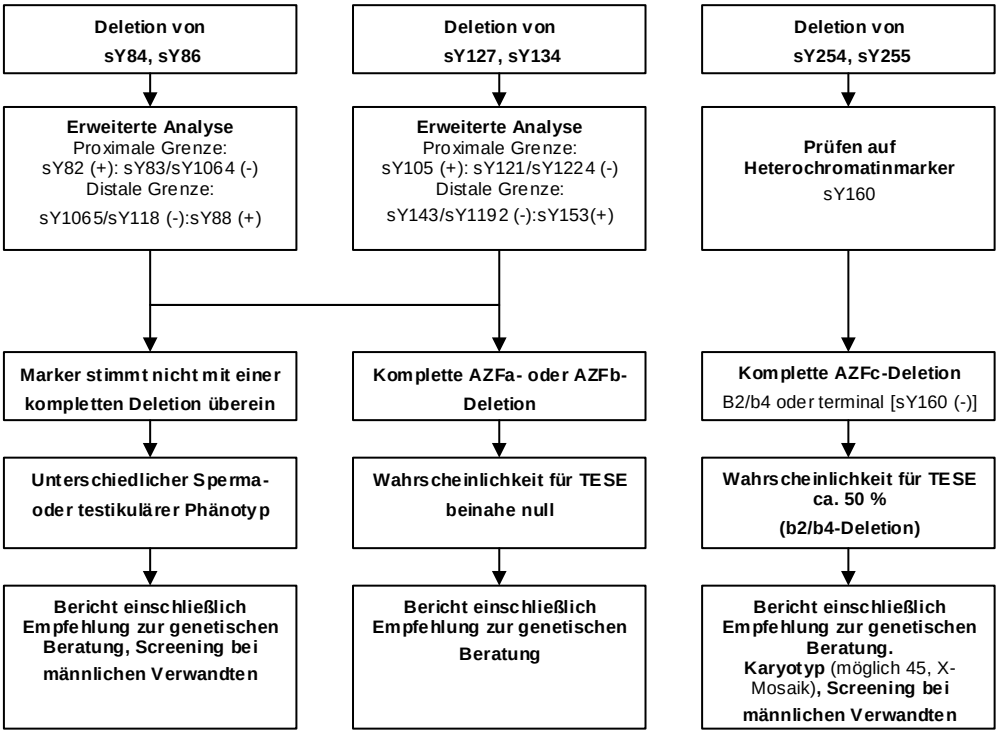


Abbildung 2: Ablaufdiagramm über die klinischen Konsequenzen des Nachweises des jeweiligen Typs häufiger Y-chromosomaler Mikrodeletionen (Krausz et al., 2014).

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Die in den Kits gelieferte normale DNA-Kontrolle wurde unabhängig getestet und für negativ für Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV) und humanes Immundefizienz-Virus (HIV) 1 und 2 befunden.

2. Bei der Arbeit mit Humanmaterial vorsichtig vorgehen. Alle Proben sind als potenziell infektiös zu betrachten. Keine Testmethode kann das Vorhandensein von HBV, HCV, HIV oder anderen infektiösen Erregern mit absoluter Sicherheit ausschließen.

3. Die Handhabung der Proben und Testkomponenten sowie deren Gebrauch, Lagerung und Entsorgung muss gemäß der durch nationale Richtlinien und Verordnungen definierten Verfahren für biologisch gefährliches Material erfolgen.

4. Im Einklang mit der aktuellen guten Laborpraxis sollten Labore eigene interne Qualitätskontrollproben bekannten Genotyps in jedem Assay mitführen, damit die Validität des Verfahrens beurteilt werden kann.

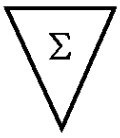
5. Bei Schäden an der Kitverpackung kann auch der Inhalt beschädigt sein. Das Kit nicht verwenden und den Kundendienst verständigen.

Symbole auf den Etiketten

Die Symbole, die auf allen Etiketten und Verpackungen verwendet werden, entsprechen dem harmonisierten Standard

ISO 15223

Hersteller



Anzahl der Tests

Gebrauchsanweisung beachten

Unterhalb der angegebenen Temperatur lagern

Nicht mehr nach dem angegebenen Datum verwenden

Bestellnummer

Los- oder Chargennummer

In-vitro-Diagnostikum

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Elucigene Male Factor Infertility-Kit

Jedes Kit enthält:

Elucigene Male Factor Infertility (TA) (Teilenummer 450208): 1 Gefäß x 250 µl (25 Tests) Reaktionsgemisch mit Primern zur Amplifizierung von X- und Y-spezifischen STR- (Short Tandem Repeat) und Nicht-STR-Markern sowie Marker für Mikrodeletionen des Y-Chromosoms. Siehe Anhang 2 für Details zu den Markern in jedem Kit. Das Reaktionsgemisch enthält ferner DNA-Polymerase und Desoxynukleosidtriphosphate in Puffer.

DNA-Kontrolle (DK) (Teilenummer 404489): 1 Gefäß x 50 µl DNA-Kontrolle, normal sowohl in Bezug auf Marker für den Nachweis einer Aneuploidie der Geschlechtschromosomen als auch auf Marker für Y-Chromosom-Deletionen im Elucigene Male Factor Infertility-Kit.

Elucigene MFI-Y*plus*-Kit

Jedes Kit enthält:

Elucigene MFI-Y*plus* (TA) (Teilnummer 450211) : 1 Gefäß x 100 µl (10 Tests) Reaktionsgemisch mit Primern zur Amplifikation von Y-Chromosom-Markern. Siehe Anhang 2 für Details zu den Markern in jedem Kit. Das Reaktionsgemisch enthält ferner DNA-Polymerase und Desoxynukleosidtriphosphate in Puffer.

DNA-Kontrolle (DK) (Teilenummer 404489): 1 Gefäß x 50 µl DNA-Kontrolle, normal in Bezug auf die Marker von Y-Chromosom-Deletionen im Elucigene MFI-Y*plus*-Kit.

Vorbereitung und Lagerung des Kits

Nach dem Öffnen des Kits wird empfohlen, das Reaktionsgemisch zu je 10 µl in die mitgelieferten 0,2-ml-PCR-Röhrchen (oder gleichwertige) zu dispensieren und bei -20 °C gefroren zu lagern. Darauf achten, dass der Röhrcheninhalt vor dem Dispensieren gründlich aufgetaut und vermischt wird.

Die Kontroll-DNA ist bei -20°C gefroren zu lagern.

Erforderliche Materialien (nicht im Kit enthalten)

Allgemeines

Labor-Verbrauchsmaterial – Handschuhe, Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss, 0,2-ml-PCR-Röhrchen oder vom Hersteller des Thermocycler empfohlene Mikrotiter-Platten, Pipettenspitzen.

Laborausstattung – Präzisionspipetten (2 Sätze: je 1 für Prä-und Postamplifikationsbereich, vorzugsweise Verdrängungspipetten), Schutzkleidung, Vortex-Mischer, Mikrozentrifuge, Zentrifuge für Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen.

PCR-Amplifikation

Thermocycler für Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen oder 0,2-ml-Röhrchen mit einer Temperaturgenauigkeit von +/-1 °C im Bereich von 33 °C bis 100 °C und einer statischen Gleichförmigkeit der Temperatur von +/-1. Die spezifikationsgerechte Leistung von Male Factor Infertility und MFI-Yplus wurde an den folgenden Thermocycler-Plattformen validiert:

- Life Technologies GeneAmp 9700
- Life Technologies Veriti Dx (Betrieb im Standardmodus)
- Life Technologies Veriti Dx (Betrieb im 9700-Simulationsmodus)
- Life Technologies Proflex (Betrieb im Standardmodus)
- Life Technologies Proflex (Betrieb im 9700-Simulationsmodus)

Kapillarelektrophorese

Kapillarelektrophorese –POP-7 Polymer (ABI Best.-Nr. 4352759), 10x Puffer für den Gen-Analysator (ABI Best.-Nr. 402824) und Hi-Di Formamid (ABI Best.-Nr. 4311320), GeneScan 600v2 LIZ Größenstandard (ABI Best.-Nr. 4408399) und DS-33 (Farbstoffset G5) Matrixstandard (ABI Best.-Nr. 4345833).

Gen-Analysatoren ABI 3130 und 3500 von Applied Biosystems (mit der aktuellen GeneMapper-Software), 36-cm-Kapillararray (50-cm-Kapillararray für den Gen-Analysator 3500), optische Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, Abdeckungen für 96 Vertiefungen, Cassetten für 96 Vertiefungen.

Datenanalyse

Eines der beiden folgenden Softwarepakete für die Datenanalyse ist erforderlich: GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems Inc.) oder höher oder GeneMarker 1.65 (SoftGenetics LLC) oder höher.

Zusätzliche Dokumentation zum Elucigene Male Factor Infertility-Produkt

Diese Gebrauchsanweisung enthält einen Abschnitt mit grundlegenden Informationen über die Auswertung der erzielten Ergebnisse. Ein zusätzlicher „Leitfaden zur Interpretation“ für Elucigene Male Factor Infertility-Produkte mit Beispielen und einem Glossar sowie ein „Leitfaden zur Analysesoftware“ können von der Elucigene-Website heruntergeladen werden:

http://www.elucigene.com/product-category/reproductive-health/

Entnahme und Lagerung der Proben

Auswertungen haben ergeben, dass Vollblutproben (EDTA) mit diesem Test kompatibel sind.

Wie gelegentlich beobachtet, können sich Probenentnahmehilfen nachteilig auf die Unversehrtheit bestimmter Analyte auswirken und einige Verfahrenstechnologien beeinträchtigen (9). Jedem Anwender wird empfohlen, das gewählte Instrument gemäß Anweisungen des Herstellers zu verwenden und darauf zu achten, dass die Probenentnahmehilfen mit diesem Test kompatibel sind.

Blutproben sollten vor der Aufbereitung der DNA bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.

DNA-Isolierung aus Vollblutproben (EDTA)

Reproduzierbare und auswertbare Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn die DNA mithilfe des QIAamp 96 DNA Blood Kit (oder des QIAamp DNA Mini Kit mit Proteinase K) entsprechend dem im QIAamp-Handbuch beschriebenen Protokoll beginnend mit 200µl flüssigem Vollblut und Verdünnung in 200 µl hochreinem Wasser extrahiert wird.

DNA-Konzentration

Unter den empfohlenen PCR-Bedingungen und unter Verwendung der empfohlenen Einstellungen für die Probeninjektion, die in dem Kapillarsäulen-Durchlaufmodul aufgeführt sind (siehe Hinweis im Abschnitt Kapillarelektrophorese), werden mit einem DNA-Einsatz von 15 ng durchgängig akzeptable Ergebnisse erzielt. Interpretierbare Ergebnisse werden allerdings mit einem DNA-Einsatz in einem Bereich zwischen 5 ng und 30 ng erzielt.

Die Quantifizierung der DNA ist sehr wichtig. Daher sollte die Konzentration aller zu testenden DNA-Proben gemessen werden, um optimale Ergebnisse zu gewährleisten. Akzeptable Methoden sind z. B. PicoGreen-Fluoreszenz oder UV-Absorbanz. Wegen der Unterschiede zwischen den Methoden zur DNA -Quantifizierung sollte der Anwender folgende Hinweise beachten:

Bei einem sehr hohen DNA-Einsatz ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass die Analysesoftware Hintergrund-Peaks markiert. Die folgenden Maßnahmen können ergriffen werden, um diese Wahrscheinlichkeit zu senken.

- DNA-Probe verdünnen und erneut amplifizieren.
- Injektionszeit senken – siehe Abschnitt „Kapillarelektrophorese“.
- Einen höheren Peak-Amplituden-Schwellenwert wählen – siehe Elucigene CF-EU2v1 Leitfaden zur Analysesoftware.

Bei einem niedrigen DNA-Einsatz ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass die diagnostischen Peaks schwach sind und nicht von der Analysesoftware markiert werden. Die folgenden Maßnahmen können ergriffen werden, um ein stärkeres Signal zu erhalten.

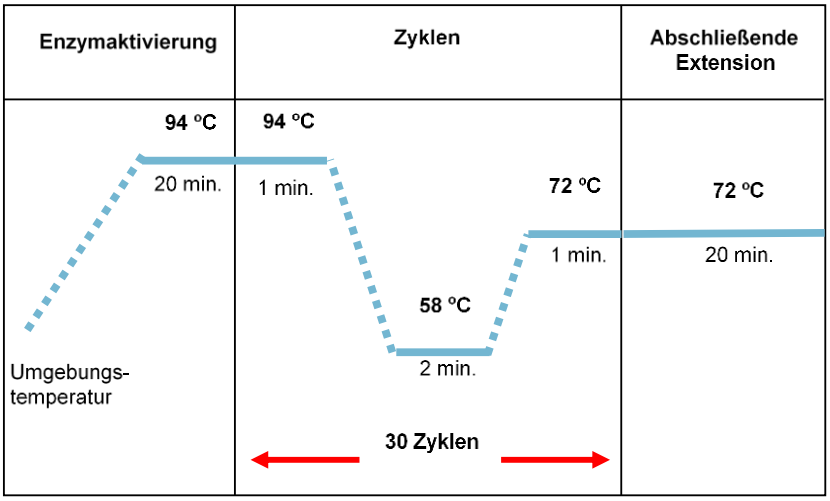
- Injektionszeit erhöhen – siehe Abschnitt „Kapillarelektrophorese“.
- Probe erneut extrahieren und in weniger Wasser (50 µl) eluieren.

Testdurchführung

Amplifikationsverfahren

Hinweis: *Um die Gefahr einer Kontamination so gering wie möglich zu halten, müssen die Schritte 3 - 5 in einem DNA-freien Bereich durchgeführt werden. Außerdem sind Maßnahmen zur Vermeidung einer Kontamination mit PCR-Produkten zu ergreifen.*

1. Den Thermocycler auf einen 20-minütigen, aus einem Schritt bei 94°C bestehenden Zyklus zur Aktivierung der DNA-Polymerase in Verbindung mit einem Amplifikationszyklus-Programm (30 Zyklen) von 1 Minute bei 94°C (Denaturierung), 2 Minuten bei 58°C (Annealing) und 1 Minute bei 72 °C (Extension) programmieren. Zusätzlich muss eine 20-minütige Verlängerung der Extension bei 72 °C im letzten Zyklus eingegeben werden.



2. Bei jedem PCR-Durchlauf muss eine Negativkontrolle (Wasser) mitlaufen. Es kann auch angemessen erscheinen, weitere Kontrollen mitzuführen, z. B. eine positive männliche Normalkontrolle (DNA-Kontrolle wird mitgeliefert) und eine normale weibliche Kontrolle (DNA wird nicht mitgeliefert).

3. Eine für die Anzahl der zu analysierenden Proben und Kontrollen ausreichende Anzahl von zuvor aliquotierten Röhrchen mit dem Reaktionsgemisch aus dem Male Factor Infertility-Produkt (Male Factor Infertility oder MFI-Yplus) auftauen (siehe Hinweis unter „Im Lieferumfang enthaltene Materialien“) und die Röhrchen 10 Sekunden lang bei 12.000 g zentrifugieren.

4. Mit separaten Pipettenspitzen 2,5 µl Test-DNA in ein Probenröhrchen mit 10 µl Reaktionsgemisch geben und durch Aufziehen und Ausstoßen mit der Pipette vermischen. Für alle zu testenden Proben ebenso verfahren.

5. Keine DNA in das PCR-Röhrchen für die Negativkontrolle geben, sondern stattdessen 2,5 µl steriles entionisiertes Wasser verwenden.

6. Die PCR-Röhrchen kurz zentrifugieren, damit sich der Inhalt am Boden der Röhrchen sammelt.

7. Alle Röhrchen fest im Block des Thermocyclers platzieren. Das Aktivierungsprogramm bei 94°C und anschließend das Amplifikationsprogramm einleiten (siehe Schritt 1).

8. Nach Abschluss des Amplifikationsprogramms können die Proben entweder bei Raumtemperatur über Nacht oder bis zu 7 Tage lang bei 2–8 °C gelagert werden, bevor die Kapillarelektrophorese durchgeführt wird.

Kapillarelektrophorese

Jedem Anwender wird empfohlen, die gewählte Ausrüstung entsprechend der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Herstellers zu bedienen und sich davon zu überzeugen, dass sie mit diesem Test kompatibel ist. In diesem Zusammenhang sind insbesondere das Polymer und das Kapillararray wichtig. Optimale Ergebnisse lassen sich mit den folgenden Bedingungen für die Kapillarelektrophorese auf einem Gen-Analysator ABI3130 oder ABI3500 erzielen.

1. 6,8 µl Größenstandard und 250 µl Hi-Di Formamid kombinieren und gründlich vermischen (Gemisch ausreichend für 16 Vertiefungen). Je 15 µl des Gemischs in die der erforderliche Anzahl an Vertiefungen auf der optischen Mikrotiterplatte* mit 96 Vertiefungen dispensieren.

2. 3 µl PCR-Produkt der Testprobe dem Größenstandardgemisch (aus Schritt 1) zugeben, das bereits in die Mikrotiterplatte gefüllt wurde, und mit der Pipette vermischen. Die Platte mit der Abdeckung versehen.

3. Das in die optische Mikrotiterplatte gefüllte PCR-Produkt auf einem Thermocycler mit folgenden Parametern denaturieren: 3 Minuten bei 94 °C in Verbindung mit 30 Sekunden bei 4 °C.

4. Die Mikrotiterplatte 10 Sekunden lang bei 1000 g zentrifugieren, damit Bläschen aus den Vertiefungen entfernt werden. Dann die Mikrotiterplatte in den Gen-Analysator laden.

*__Hinweis__: *Es ist unbedingt notwendig, unbenutzte Vertiefungen (d. h. Vertiefungen, in die keine DNA-Probe geladen wurde) trotzdem mit Hi-Di Formamid zu befüllen, damit die Kapillaren nicht austrocknen.*

Die Einstellungen für die Probeninjektion können dabei je nach der in der PCR-Reaktion erzeugten Amplikonmenge, die von der eingesetzten Genom-DNA abhängt, geändert werden. Durch Reduktion der Injektionszeit bzw. -spannung kann der Säule weniger Amplikon zur Analyse zugeführt werden. Umgekehrt bedeutet eine längere Injektionszeit bzw. -spannung eine größere der Säule zugeführte Amplikonmenge. Zuvor amplifizierte Proben können zur erneuten Analyse mehrfach erneut injiziert werden.

Datenanalyse nach der PCR

GEN-ANALYSATOR ABI3130

Die Produktreihe Male Factor Infertility ist mit dem Elucigene CFEU2v1-Produkt kompatibel. Daher können die Male Factor Infertility-Produkte mithilfe der bestehenden CFEU2v1-Durchlaufmodule und -einstellungen angewandt werden. Alternativ kann der Anwender ein separates Male Factor Infertility (MFI)-Durchlaufmodul erstellen. Dazu ist wie folgt vorzugehen:

Mit der Datenerfassungssoftware des 3130 ein Probenblatt mit den nachstehenden Einstellungen erstellen:

• Probenbezeichnung: Hier muss die gleiche, probenspezifische Bezeichnung bzw. Nummer angegeben werden.

• Eigentümer des Durchlaufs: Den Standardeigentümer für das Labor auswählen.

• Durchlaufprotokoll: MFI (enthält MFI-3130-Durchlaufmodul)*

*__Hinweis:__ *Es muss ein Durchlaufmodul, das Einzelheiten zu den Instrumenteneinstellungen enthält, erstellt und anschließend einem Durchlaufprotokoll zugewiesen werden, in dem das Farbstoffset G5 ausgewählt wurde. Weitere Informationen zur Erstellung von Durchlaufmodulen sind dem Bedienerhandbuch des jeweiligen Gerätes zu entnehmen.*

DURCHLAUFMODUL 3130

FÜR POP7-POLYMER

36-cm-Kapillarmodul: MFI

Das MFI-Durchlaufmodul im Module Manager (Modulverwaltung) der 3130-Datenerfassungssoftware erstellen. Darauf achten, dass Folgendes ausgewählt wird:

- Type: Regular (Typ: Normal)
- Template (Vorlage:) FragmentAnalysis36_POP7
- Die in der nachstehenden Tabelle beschriebenen Einstellungen eingeben:

Nr.	Parameterbezeichnung	Wert	Bereich
1	Oven Temperature	60	int 18…65 Deg.C
2	Poly_fill_Vol.	6500	6500…38000 steps
3	Current Stability	5,0	int 0…2000 uAmps
4	PreRun_Voltage	15,0	0…15 kvolts
5	Pre_Run_Time	180	1…1000 sec.
6	Injection_Voltage	3,0	1…15 kvolts
7	Injection_Time	12,0	1…600 sec.
8	Voltage_Number_of_Steps	20	1…100 nk
9	Voltage_Step_Interval	15	1…60 sec.
10	Data_Delay_Time	60	1…3600 sec.
11	Run_Voltage	15,0	0…15 kvolts
12	Run_Time	1200	300…14000 sec.

Hinweis: *Der erforderliche Wert für „Run Time“ (Durchlaufzeit) kann je nach Umgebungstemperatur am Aufstellort des Gen-Analysators variieren. Weitere Informationen zur Erstellung von Durchlaufmodulen gehen aus dem Benutzerhandbuch für den Gen-Analysator 3130 von Applied Biosystems hervor.*

Das MFI-Protokoll im Protocol Manager (Protokollverwaltung) erstellen. Darauf achten, dass Folgendes ausgewählt wird:

- Type: Regular (Typ: Normal)
- Run Module (Durchlaufmodul): MFI (siehe Durchlaufmodul oben)
- Dye Set (Farbstoffset): G5

Für einen Durchlauf mit den Proben mit dem Plate Manager (Plattenverwaltung) ein Probenblatt erstellen und darauf achten, dass im Instrumentenprotokoll das richtige Protokoll ausgewählt wird (siehe oben).

Hinweis: *Weitere Informationen zu Einrichtung, Betrieb und Fehlersuche für das Instrument gehen aus dem Benutzerhandbuch für den Gen-Analysator 3130 von Applied Biosystems hervor .*

GEN-ANALYSATOR ABI3500

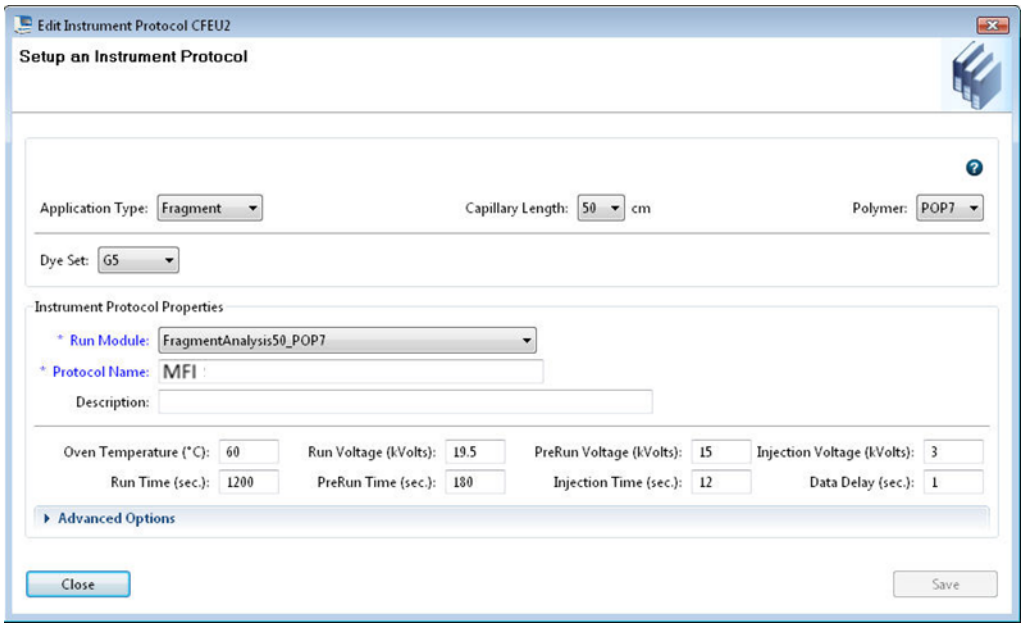
Es muss ein MFI-Instrumentenprotokoll erstellt werden, das dann für jeden Durchlauf des Male Factor Infertility-Produkts verwendet werden kann.

Das MFI-Instrumentenprotokoll über die Instrumentenprotokoll-Bibliothek des 3500 erstellen.

Darauf achten, dass Folgendes ausgewählt wird:

• Durchlaufmodul: FragmentAnalysis50_POP7

• Die in der nachstehenden Abbildung beschriebenen Einstellungen eingeben:

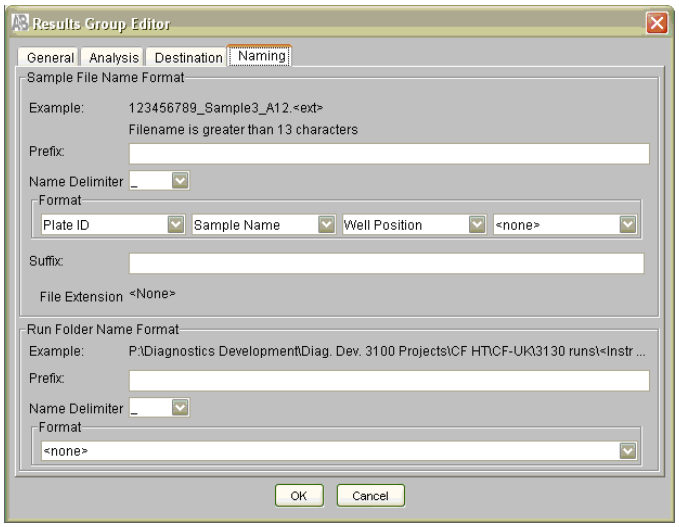


Für einen Durchlauf mit den Proben durch Klicken auf „Create Plate from Template“ (Platte nach Vorlage erstellen) unter „Dashboard“ eine Probenplatte erstellen und darauf achten, dass das richtige Instrumentenprotokoll für MFI ausgewählt wird (siehe oben).

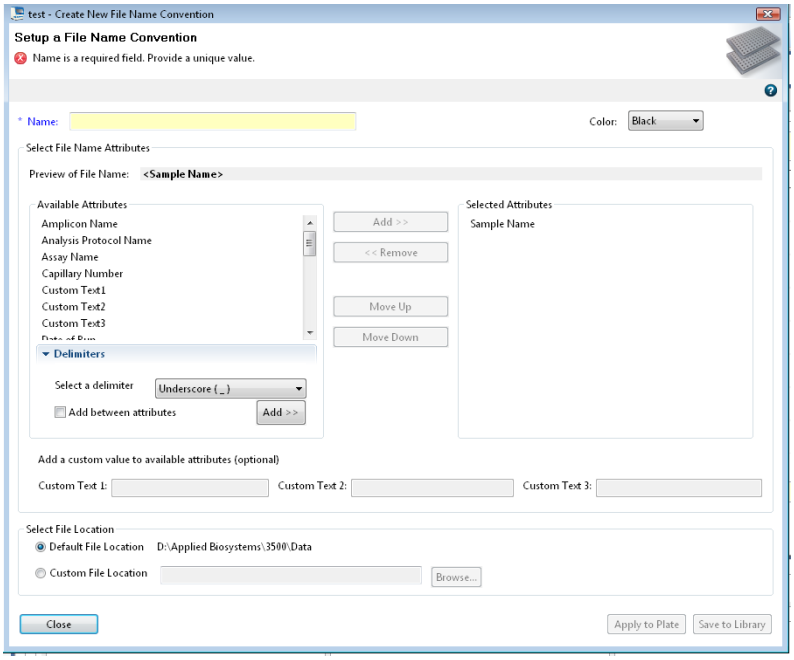
Einrichtung des Probenblattes für GeneMarker:

Mit der GeneMarker Software ist ein direkter Vergleich zwischen den A- und B-Daten derselben Person möglich. Dafür ist es wichtig, dass die Bezeichnung der Rohdaten-Ausgabedatei (fsa-Datei) für alle Proben und Gemische einheitlich ist. Das Probenblatt sollte den eindeutigen Probennamen für jede zu testende Probe mit dem Suffix _A bzw. _B enthalten, je nachdem, welches Gemisch getestet wird. Soll der fsa-Name die Platten-ID enthalten, sollte immer dasselbe Format verwendet werden, z. B. MFI TTMMJJJJ.

Auf dem **3130** sollten die Parameter für „Results Destination“ (Ergebnisziel) so eingestellt sein, dass die Probenbezeichnung im fsa-Dateinamen enthalten ist, z. B. MFI TTMMJJJJ**_1234,5_A_**A01.



Auf dem **3500** sollten Dateinamenkonventionen so eingestellt sein, dass die Probenbezeichnung im fsa-Dateinamen enthalten ist, z. B. MFI TTMMJJJJ**_1234,5_A_**A01.



Analyse und Interpretation der Ergebnisse

Allgemeine Interpretation der Ergebnisse

PCR-Produkte werden als mit 5 Farbstoffen markiertes System mit dem Filterset G5 beobachtet. Filterset G5 weist die mit 6-FAM (blau), VIC (grün), NED (gelb) und PET (rot) markierten Fragmente sowie den mit LIZ (orange) markierten Größenstandard auf einem Elektropherogramm und im GeneMapper- bzw. GeneMarker-Programm nach.

http://www.elucigene.com/product-category/reproductive-health/

Wichtiger Hinweis: *Verschiedene Kombinationen von Gerät, Polymer und Größenstandard können leicht unterschiedliche Größenauszeichnungen verursachen. Während der Validierung des Kits sollte der Anwender prüfen, dass die Standard-Bin-Einstellungen zu einer korrekten Peakauszeichnung führen, und ggf. Korrekturen vornehmen. Bei etwaigen Schwierigkeiten kann der technische Kundendienst (techsupport@elucigene.com) weiterhelfen.*

Allgemeine Analyserichtlinien für alle Male Factor Infertility-Kits

1. Die Negativkontrolle sollte im Lesebereich von 100 bis 550 bp keine scharfen Peaks aufweisen.
2. Die Positivkontrolle muss die erwarteten Ergebnisse zeigen, wobei alle Peaks die nachstehend aufgeführten Kriterien erfüllen müssen.
3. Bei der Analyse von Aneuploidien in DNA-Proben muss für jeden getesteten Marker mindestens 1 Peak beobachtet werden. Der akzeptable Bereich für auf dem Gen-Analysator 3130 analysierte Marker-Peaks liegt sowohl für die Aneuploidie- als auch die Mikrodeletionsanalyse zwischen 50 und 6000 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU). Bei den Gen-Analysatoren 3500 liegt er zwischen 175 und 32.000 RFU. Peakhöhen außerhalb dieses Bereichs dürfen nicht analysiert werden.
4. Elektropherogramme von schlechter Qualität aufgrund von übermäßigem Durchschlagen zwischen Farbstofffarben (auch als „Pull-Up“ bezeichnet) oder „Elektrophorese-Spikes“ (scharfe Peaks in mehr als einem Farbstoff) sollten nicht interpretiert werden. Die PCR-Produkte sollten erneut injiziert und analysiert werden.
5. Die Aneuploidie-Analyse erfolgt durch Beurteilung der Peak-Verhältnisse (A1/A2), wobei A1 die Peakfläche des kürzeren Fragments und A2 die Peakfläche des längeren Fragments bezeichnet. Das resultierende Verhältnis ist für die Kopienzahl am betreffenden Locus diagnostisch. Bei disomen Chromosomen sollten heterozygote Marker zwei Peaks von ähnlicher Höhe zeigen. Eine vollständige Analyse des Kopienzahl-Status eines Chromosoms erfolgt durch Vergleich der Peakflächen-Verhältnisse.
6. Heterozygote Zwei-Allel-Marker sollten in einem Verhältnisfenster von 0,8 bis 1,4 liegen. Für mehr als 24 bp auseinander liegende Allele ist jedoch ein Größenverhältnis von bis zu 1,5 annehmbar. Werte, die in diesen Bereich fallen, werden als ein Verhältnis von 1:1 angegeben. Falls die Verhältnisbalance außerhalb dieses Fensters liegt, kann dies auf einer Reihe von Faktoren beruhen, z. B.:
    - Trisomie des gesamten Chromosoms (Geschlechtschromosom)
    - Trisomie eines Teils des Chromosoms (einschließlich submikroskopische Duplikationen)
    - Mosaik
    - Kontamination durch einen zweiten Genotyp
    - Durch Stotter-Peaks verursachte Verzerrung
    - Durch präferenzielle Amplifikation eines Allels verursachte Verzerrung
    - Primerstellen-Polymorphismen
    - Somatische Mikrosatelliten-Mutationen

Im **„Leitfaden zur Interpretation“ für Elucigene Male Factor Infertility-Produkte**, der auf der Elucigene-Website verfügbar ist, sind Beispiele von typischen Profilen für viele dieser Fälle enthalten. Homozygote Marker sind nicht informativ, da sich kein Verhältnis bestimmen lässt.

Analyse der Geschlechtschromosom-Marker AMEL, TAF9, XHPRT, DXYS218 und SRY (Male Factor Infertility-Kit):

Um die Interpretation eines Ergebnisses für diese Marker als abnorm zu stützen, müssen mindestens zwei für einen Drei-Allel-Genotyp sprechende informative Marker vorhanden sein und alle anderen Marker nicht informativ sein. Ein Ergebnis nur aufgrund der Informationen von einem einzigen Marker als abnorm zu beurteilen, wird nicht empfohlen.

1. Der AMEL-Marker amplifiziert nicht-polymorphe Sequenzen auf dem X- (104 bp) und Y- (110 bp) Chromosom und kann dazu verwendet werden, das Vorhandensein bzw. Fehlen des Y-Chromosoms zu bestimmen. Er steht für die relative Menge der X- gegenüber der Y-Sequenz. Bitte beachten, dass in seltenen Fällen ein Versagen der Amplifikation aufgrund einer Mutation der AMEL-Y-Sequenz berichtet worden ist.

2. TAF9L ist ein invarianter paraloger Marker mit Sequenzen auf den Chromosomen 3 und X. Der für Chromosom 3 spezifische Peak (116 bp, steht für 2 Kopien von Chromosom 3) kann daher als Referenzpeak zur leichteren Bestimmung der Anzahl der vorhandenen X-Chromosome (Peak bei 121 bp) dienen. Bei einer Analyse in Verbindung mit Amelogenin und den anderen Geschlechtschromosom-Markern ist er besonders nützlich für die Diagnose einer Aneuploidie der Geschlechtschromosomen. Bei normalen Mädchen liegen die Marker in einem Verhältnisfenster von 0,8 bis 1,4. Bei normalen Jungen ergeben die Marker ein Verhältnis von ≥ 1,8. Weitere Einzelheiten zur Interpretation des TAF9L-Markers sind im „Leitfaden zur Interpretation“ für die **Elucigene Male Factor Infertility-Produkte** enthalten.

3. Der polymorphe STR-Marker DXYS218 liegt sowohl auf dem X- als auch auf dem Y-Chromosom vor und steht für die Gesamtzahl der Geschlechtschromosomen. Für informative Ergebnisse bei Jungen ist eine Bestimmung, welches Allel für das X- bzw. Y-Chromosom steht, nicht möglich.

4. Der informative X-spezifische Marker XHPRT steht für die Anzahl an X-Chromosomen.

5. Der Y-spezifische Marker SRY ergibt bei normalen Jungen einen Einzelpeak und amplifiziert bei normalen Mädchen nicht.

Analyse von Markern für Y-chromosomale Mikrodeletionen (Male Factor Infertility und MFI-Y*plus*):

1. Alle Mikrodeletionen des Y-Chromosoms werden mit einem Einzelpeak dargestellt. Der Verlust eines Peaks entspricht einer Mikrodeletion in dieser Region.

2. Der ZFX/ZFY-Marker steht für Sequenzen auf sowohl dem X- als auch dem Y-Chromosom. Da sich das aus den beiden Sequenzen erzeugte Amplikon nicht anhand der Größe unterscheiden lässt, gibt dieser Marker unabhängig vom Probengeschlecht einen Einzelpeak aus. Dieser Marker ist nicht für die diagnostische Anwendung vorgesehen, sondern dient als Amplifikationskontrolle.

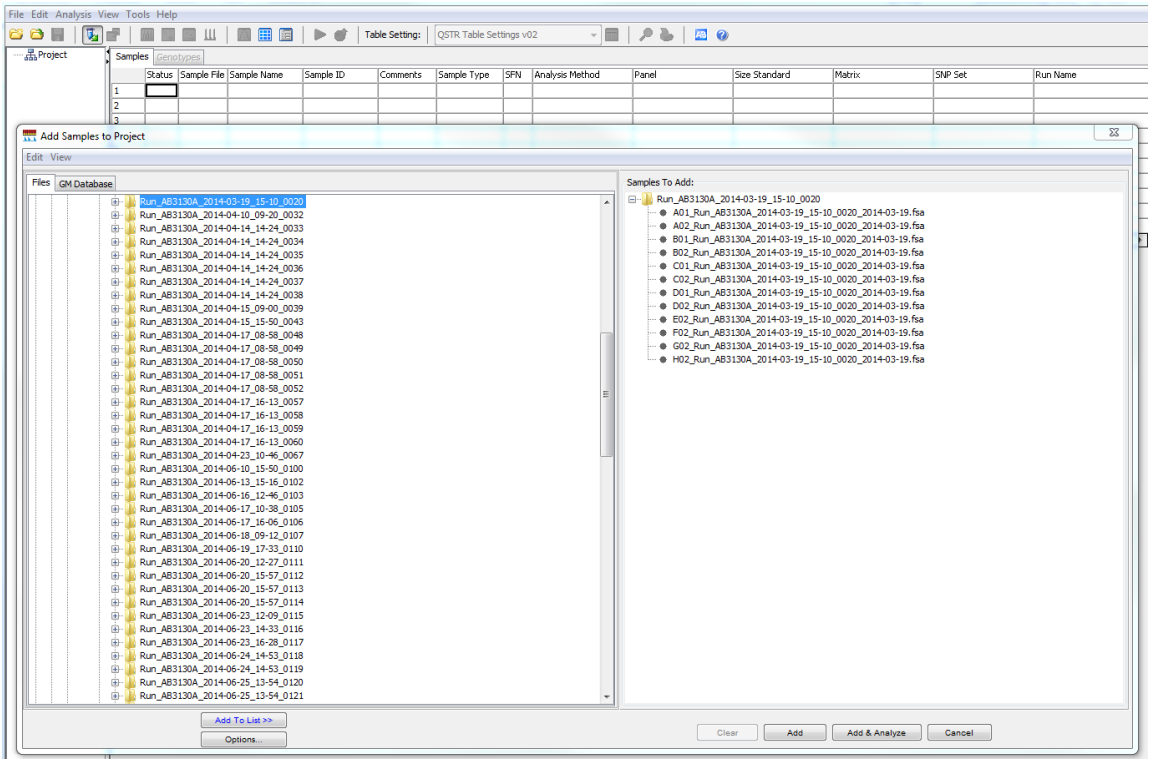
Analyseleitfaden für GeneMapper

Import und Analyse von Male Factor Infertility-Produkt-Dateien

1. Die Programmdatei GeneMapper öffnen.
2. Auf klicken, um einem neuen Projekt Dateien hinzuzufügen. Zum Speicherort der Rohdateien .fsa navigieren, die entsprechenden Dateien markieren und auf die Schaltfläche „**Add to List>>**“ (Zur Liste hinzufügen) klicken.
3. Der Durchlaufordner erscheint nun im Fenster „**Samples to Add**“ (Hinzuzufügende Proben). Durch Doppelklicken auf das Durchlaufordner-Symbol in diesem Fenster werden die einzelnen zu importierenden fsa-Dateien angezeigt. Die Proben werden dann durch Klicken auf die Schaltfläche

(Hinzufügen) am unteren Bildschirmrand hinzugefügt. Nun werden die Dateien im GeneMapper-Hauptfenster angezeigt (Abbildung 2).

Abbildung 2: Proben, die dem Projekt hinzugefügt werden können



Importieren der Male Factor Infertility-GeneMapper-Analyseeinstellungen in den GeneMapper Manager

Die Male Factor Infertility-Einstellungen für GeneMapper müssen importiert werden. Dieser Prozess wird über die Benutzeroberfläche „**GeneMapper Manager**“ gesteuert. Die Male Factor Infertility-GeneMapper-Einstellungen sind auf der Elucigene-Webseite verfügbar:

http://www.elucigene.com/product-category/reproductive-health/

1. Den „**GeneMapper Manager**“ durch Klicken auf das Symbol öffnen.
2. Die Registerkarte „Analysis Methods“ (Analysemethoden) auswählen und dann auf die Schaltfläche „Import“ (Importieren) drücken.
3. Zu der/den benötigten Datei(en) für die Male Factor Infertility-Produkt-Analyseeinstellungen navigieren und sie importieren (Male Factor Infertility oder MFI-Yplus (3130 oder 3500)).
4. Auf die gleiche Art und Weise die entsprechende Registerkarte für folgende Einstellungen auswählen und die entsprechenden Dateien importieren:
    - Table Setttings (Tabelleneinstellungen)
    - Plot Settings (Grafikeinstellungen)
    - Size Standards (Größenstandards)

    Hinweis: *Für „Cluster Plot Settings“ (Clustergrafikeinstellungen), „Matrices“ (Matrizen), „SNP Sets“ (SNP-Sätze) und „Report Settings“ (Berichteinstellungen) müssen keine Dateien importiert werden.*

    Hinweis: *Wenn die Male Factor Infertility- oder MFI-Yplus-Kits in Verbindung mit dem Elucigene CFEU2-Kit (zystische Fibrose) angewandt werden, können stattdessen die CFEU2-Standardgrößeneinstellungen verwendet werden.*

Importieren von Male Factor Infertility-Produkt-Einstellungen in den Panel Manager

Die Male Factor Infertility- und MFI Y-plus-Panel- und Bin-Einstellungen für GeneMapper müssen importiert werden. Dieser Prozess wird durch die Benutzeroberfläche „Panel Manager“ gesteuert.

Male Factor Infertility-Panel-und Bin-Einstellungen für GeneMapper sind auf der Elucigene-Webseite verfügbar:

http://www.elucigene.com/product-category/reproductive-health/

1. Das Programm Panel Manager durch Klicken auf das Symbol öffnen.

2. Im linken Navigationsfenster auf „**Panel Manager**“ klicken. Panel Manager ist nun blau markiert.

3. „File/Import Panels“ (Datei/Panels importieren) auswählen. Zur GeneMapper-Paneldatei „**Male Factor Infertility_Panels.txt**“ navigieren und sie importieren (Abbildung 4). Für MFI-Yplus alternativ **MFI Y-plus_Panels.txt** auswählen.

4. Die Paneldatei wird nun im linken Navigationsfenster angezeigt. Die Paneldatei anklicken, sodass sie blau markiert ist.

5. „**File/Import Bin Set**“ (Datei/Binsatz importieren) auswählen. Zur GeneMapper-Bindatei „**Male Factor Infertility_Male Factor Infertility_ bins.txt**“ navigieren und sie importieren (Abbildung 5). Für MFI-Y*plus* alternativ MFI Y-plus_ MFI Y-plus_bins.txt auswählen.

6. Auf „Apply“ (Anwenden) und dann auf „OK“ klicken.

Abbildung 4: Importieren der Male Factor Infertility-Kit-Paneldatei

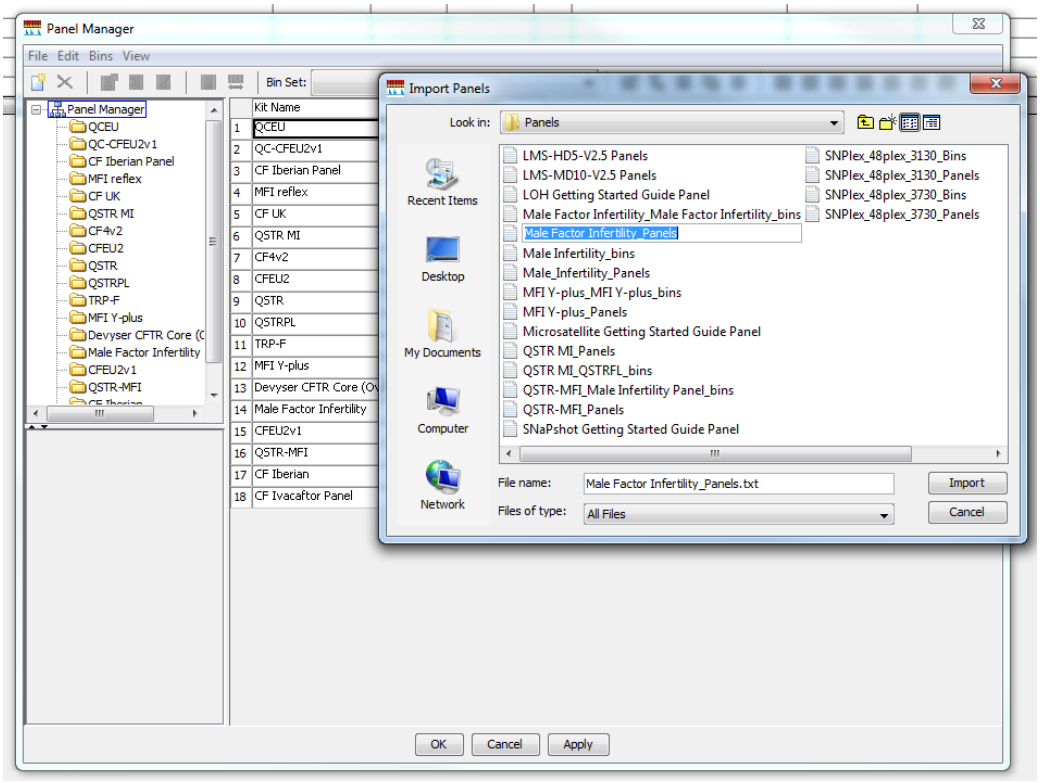
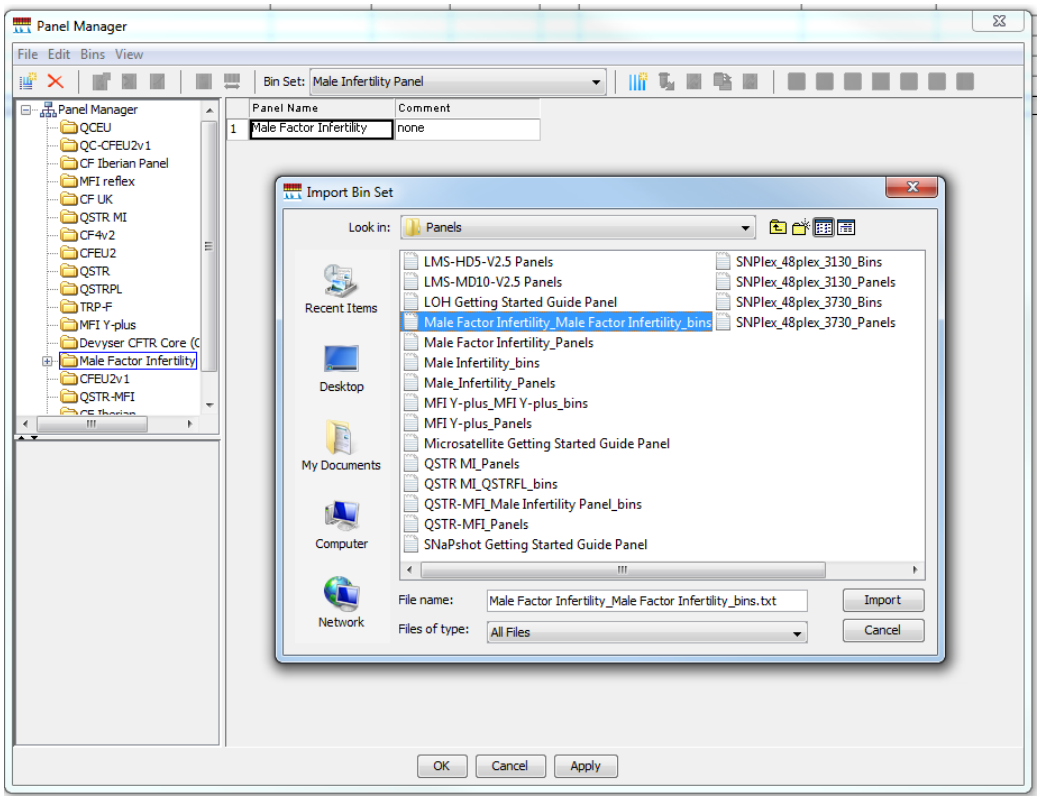


Abbildung 5: Importieren der Male Factor Infertility-Kit-Bindatei



Ändern der Analyseparameter-Datei

Möglicherweise müssen die voreingestellten „**Analysis Ranges**“ (Analysebereiche) in den QST*R-Analyseeinstellungen auf die jeweiligen Testbedingungen angepasst werden. Der minimale Analysebereich hängt vom während der Datenerfassung verwendeten Kapillarmodul und Polymer ab.
Anzeige der aktuellen Analyseeinstellungen:

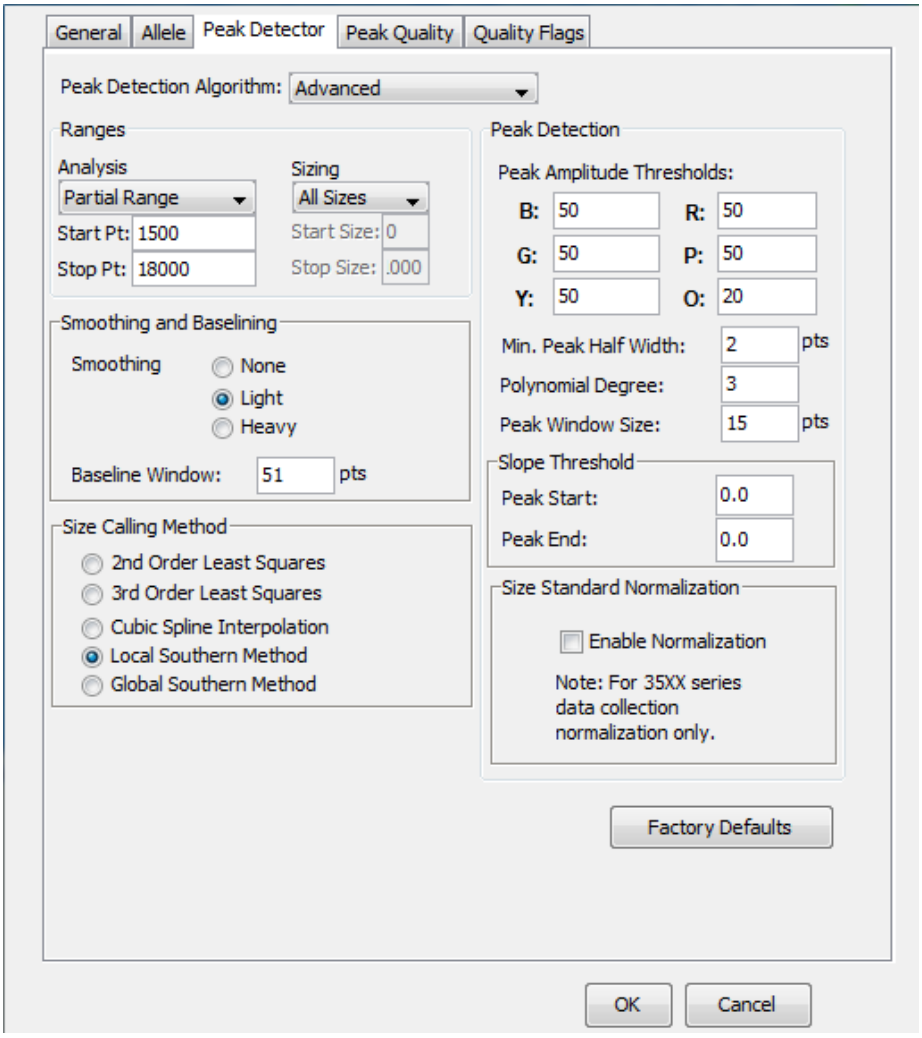
1. Den „**GeneMapper Manager**“ durch Klicken auf das Symbol öffnen.

2. Die Registerkarte „**Analysis Methods**“ (Analysemethoden) auswählen. Die importierte Male Factor Infertility-Produkt-Datei wird im Falle von Male Factor Infertility als „**Male Factor Infertility Analysis Settings**“ (Analyseeinstellungen) oder bei MFI-Y*plus als „**Male Factor Infertility Y-plus**“* aufgeführt.

3. Für **Male Factor Infertility auf „Male Factor Infertility Panel**“ bzw. für MFI-Y*plus auf „**Male Factor Infertility Y-plus**“* klicken. Die Zeile ist nun markiert.

4. Auf die Schaltfläche „Open“ (Öffnen) klicken, und die Registerkarte „Peak Detector“ (Peakdetektor) auswählen (Abbildung 6).

Abbildung 6: Analysebereiche



Bestimmen des korrekten Analysebereichs für das jeweilige Labor:

1. Im GeneMapper-Hauptfenster auf den importierten Durchlaufordner doppelklicken, um die darin enthaltene Liste mit fsa-Dateien anzuzeigen.

2. Eine .fsa-Datei auswählen.

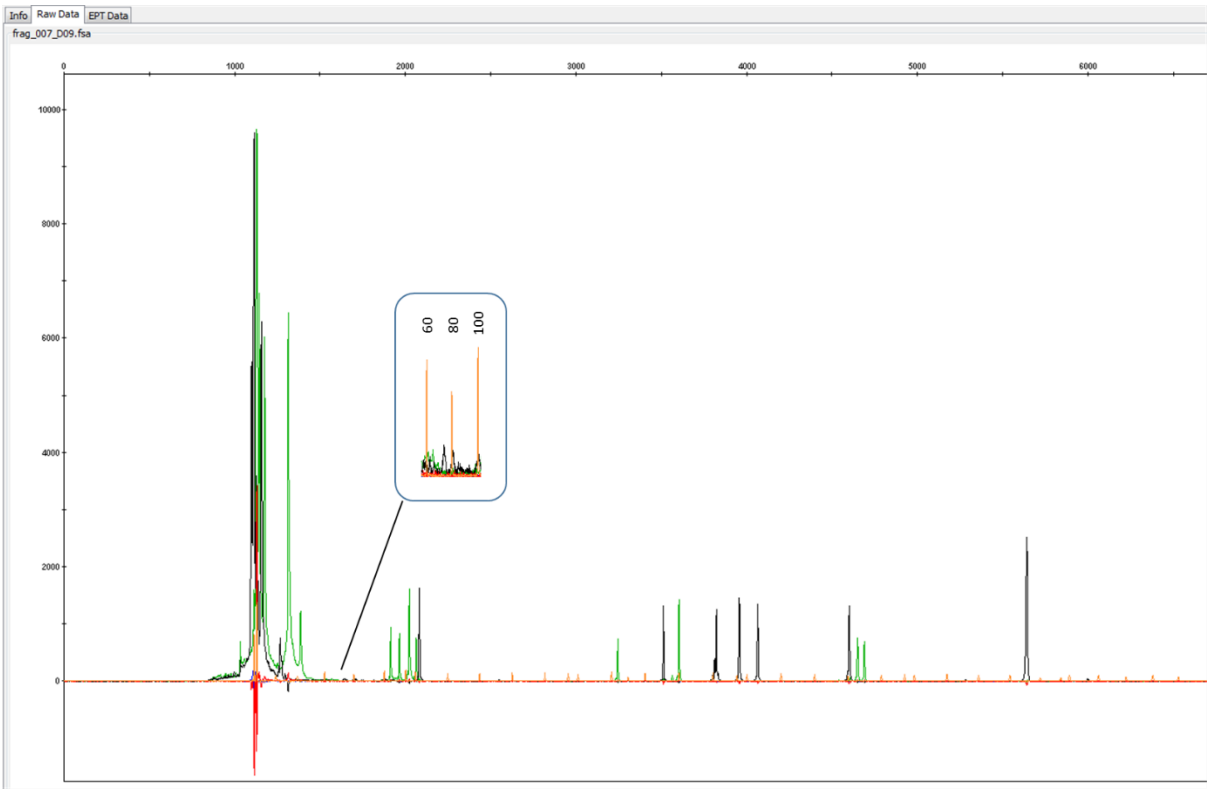
3. Durch Klicken auf die Registerkarte „Raw data“ (Rohdaten) wird das Elektropherogramm der Rohdaten angezeigt.

4. Mit dem ersten Peak des Größenstandards (z. B. 60 bp von GS600LIZv2) als Anhaltspunkt einen ungefähr 100 Datenpunkte größeren Datenpunkt auswählen (Abbildung 7). Damit wird der niedrigste Punkt im analysierbaren Bereich festgelegt.

5. Sicherstellen, dass der maximale Analysebereich den größten Peak des Größenstandards umfasst (z. B. 600 bp von GS600LIZv2).

6. Die neuen Werte in die Analysedatei eingeben (der Zugriff darauf erfolgt wie oben beschrieben).

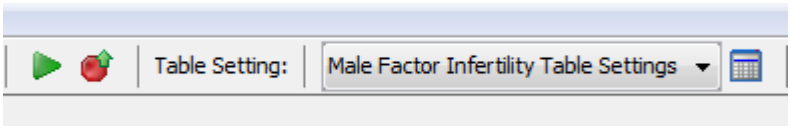
Abbildung 7: Bestimmen des minimalen Bereichs anhand von Probenrohdaten



Analyse von importierten Male Factor Infertility-Produkt-Paneldateien

1. Im GeneMapper-Hauptfenster „Male Factor Infertility Table Settings“ (Tabelleneinstellungen) auswählen (Abbildung 8).

Abbildung 8 Einstellen der Tabelleneinstellungen



2. Unter „Analysis Method“ (Analysemethode) „Male Factor Infertility-Analysis Settings“ (Analyseeinstellungen) bzw. für MFI-Y*plus* „Male Factor Infertility Y-plus“ auswählen. Alle Spalten ausfüllen, indem „**Ctrl+D**“ (Strg+D) gedrückt wird. Diesen Vorgang wiederholen, indem „**Male Factor Infertility**“ oder „**MFI Y-plus**“ unter der Spaltenüberschrift „Panel“ und „**Male Factor Infertility Size Standard**“ unter der Spaltenüberschrift „Size Standard“ (Größenstandard) gewählt wird. Jedes Mal darauf achten, alle Spalten durch Drücken von „**Ctrl+D**“ (Strg+D) auszufüllen, um sicherzustellen, dass jede Einstellung auf die komplette Probenliste angewandt wird.

3. Zum Starten der Probenanalyse auf klicken. Bei entsprechender Aufforderung einen Projektnamen zuweisen.

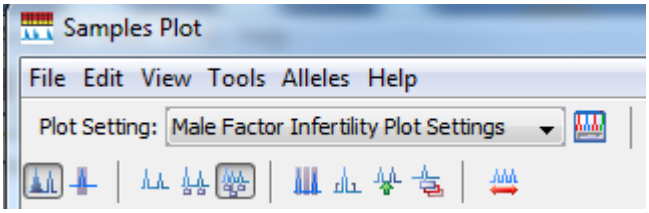
Prüfen der Male Factor Infertility-Produkt-Daten

1. Die zu analysierende Probe auswählen (Zeile der Probe markieren).

2. Zur Grafikanzeige „Display Plots“ (Grafiken anzeigen) klicken.

3. Je nachdem welches Kit analysiert wird, entweder **„Male Factor Infertility Plot Settings“** (Grafikeinstellungen) (Abbildung 9) oder **„MFI Y-plus“** auswählen.

Abbildung 9: Dropdownmenü der Male Factor Infertility-Grafikeinstellungen.



4. Das „Plot Window“ (Grafikfenster) zeigt das Probenprofil mit den Tabellendaten an (Abbildung 10).
GeneMapper beschriftet automatisch bis zu zwei Peaks für jeden Marker. Falls für einen Marker drei Allele vorhanden sind, sollte der dritte, nicht markierte Peak manuell beschriftet werden (siehe „Manuelle Bearbeitung von Profilen“ weiter unten).

Hinweis: *Die Allel-Größenbereiche für jeden Marker beruhen auf früher beobachteten Daten. Seltene Allele können außerhalb des angegebenen Marker-Größenbereichs fallen, sodass es erforderlich sein kann,*
den Binsatz entsprechend zu modifizieren.

5. Es wird empfohlen, für das „Plot Window“ (Grafikfenster) „**Single click editing**“ (Einzelklick-Bearbeitung) zu aktivieren. Dazu „**Alleles/set click editing**“ (Allele/Klickbearbeitung einstellen) auswählen und darauf achten, dass diese Option markiert ist.

Abbildung 10: Beispiele für ein Grafikfenster mit beschrifteten Spurdaten und der zugehörigen Genotyp-Tabelle

Manuelle Bearbeitung von Profilen

WARNUNG!

GeneMapper beschriftet nur bis zu 2 Peaks pro Marker. Daher kann eine manuelle Bearbeitung von Profilen erforderlich sein, z. B. um den 3. Peak (sofern vorhanden) zu beschriften oder die Beschriftung von einem Stotter-Peak zu entfernen.

Um einen Peak zu beschriften, den unbeschrifteten Peak mit der linken Maustaste anklicken. Es erscheint die Option „Add Allele Comment“ (Allel-Beschriftung hinzufügen). Auf „OK“ klicken. Daraufhin wird der Peak mit seiner Größe (in Basenpaaren) und der Peakfläche beschriftet. Der neu beschriftete Peak wird automatisch in die Tabelle aufgenommen.

Um eine Beschriftung von einem Peak zu entfernen, die Beschriftung des Peaks mit der linken Maustaste anklicken. Es erscheint die Option „Delete Allele Comment“ (Allel-Beschriftung löschen). Auf „OK“ klicken. Die Beschriftung des Peaks wird nun entfernt. Die gelöschten Peakdaten werden automatisch aus der Tabelle entfernt.

Kopieren von Tabellendaten

1. Alle Zeilen in der Tabelle unten im Grafikfenster markieren.
2. Die ausgewählten Zeilen mit der Tastenkombination „**Ctrl+C**“ kopieren.

Analyseleitfaden für GeneMarker

Hinzufügen von Probendateien zu GeneMarker

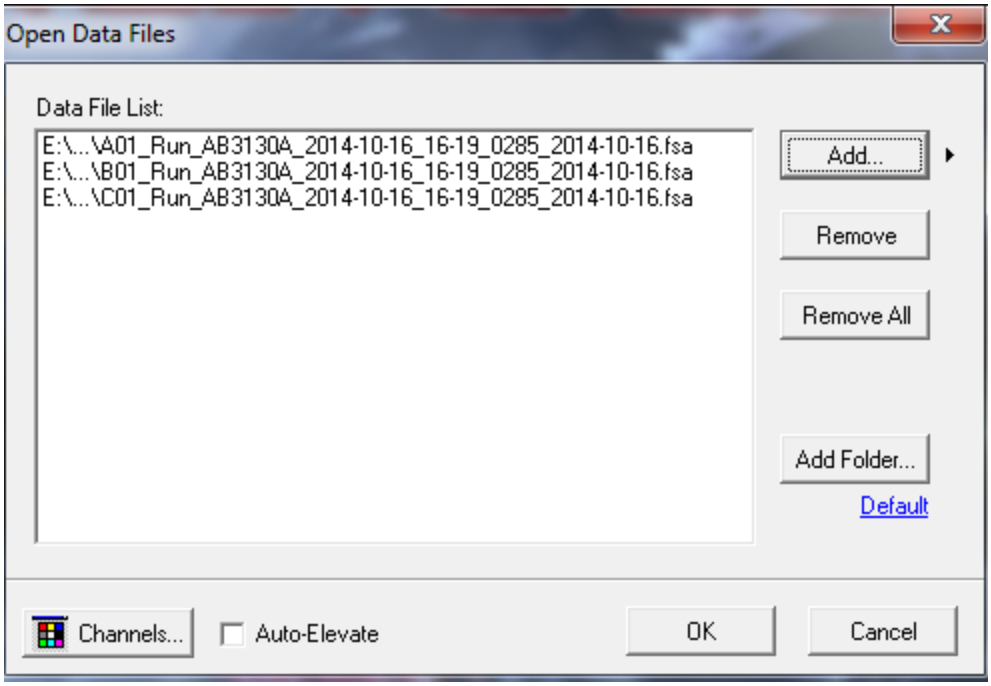
Die GeneMarker-Programmdatei öffnen und nach Aufforderung „**Open Data**“ (Daten öffnen) auswählen. Das Feld „Open Data Files“ (Datendateien öffnen) öffnet sich.

Auf die Schaltfläche „**Add**“ (Hinzufügen) klicken. Das Dialogfeld „Open“ (Öffnen) öffnet sich. Zum Verzeichnis mit den Rohdatendateien navigieren.

1. Mit STRG+A alle Dateien oder mit der STRG-Taste und/oder der Umschalttaste einzelne Proben auswählen.

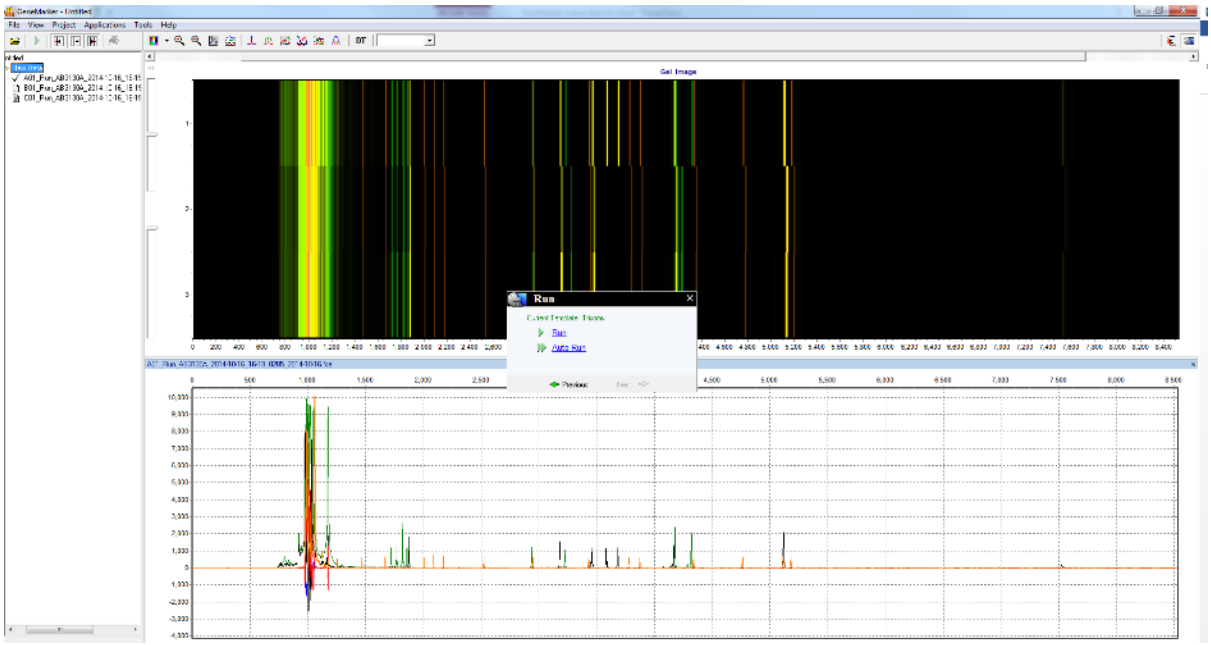
2. Im Dialogfeld „Open“ (Öffnen) auf die Schaltfläche „Open“ (Öffnen) klicken. Die ausgewählten Dateien erscheinen im Feld „Data File List“ (Datendateienliste) (Abbildung 11).

Abbildung 11: Der „Data File List“ (Datendateiliste) hinzugefügte Proben



3. Im Feld „Open Data Files“ (Datendateien öffnen) auf die Schaltfläche „OK“ klicken; die Proben werden in GeneMarker hochgeladen. Die Software öffnet dann automatisch das Fenster „Raw Data Analysis“ (Rohdatenanalyse) (Abbildung 12).

Abbildung 12: Raw Data Analysis Window (Rohdatenanalysefenster)



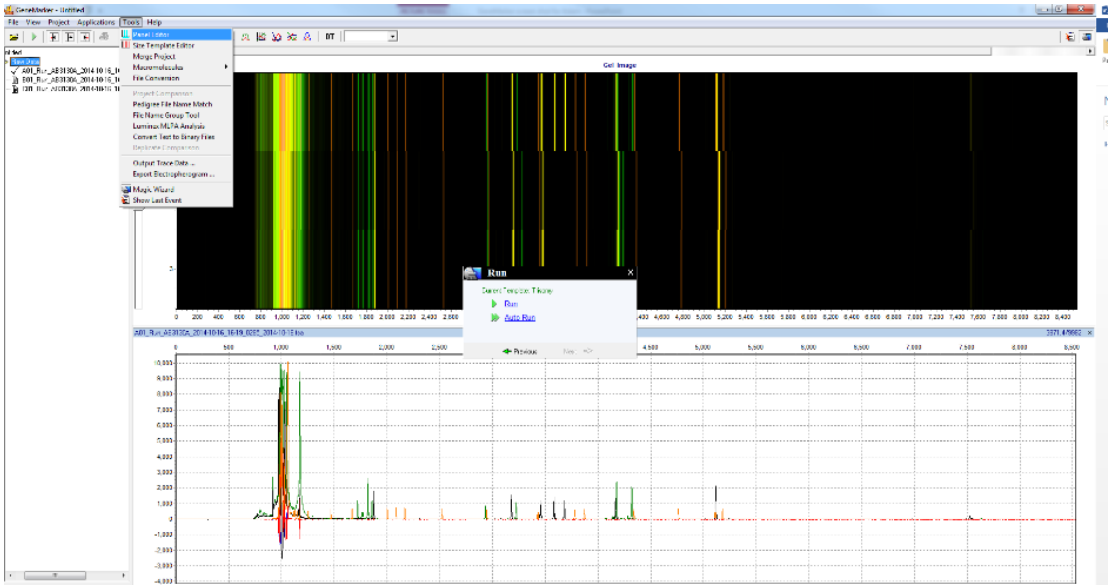
Importieren von Male Factor Infertility-Produkt-Paneleinstellungen in GeneMarker

Die Male Factor Infertility-Produkt-Einstellungen für GeneMarker müssen importiert werden. Dieser Prozess wird durch die Benutzeroberfläche „Panel Editor“ gesteuert.

Die Male Factor Infertility-Produkt-Einstellungen für GeneMarker sind auf der Elucigene-Webseite verfügbar:
www.elucigene.com/product-category/reproductive-health/

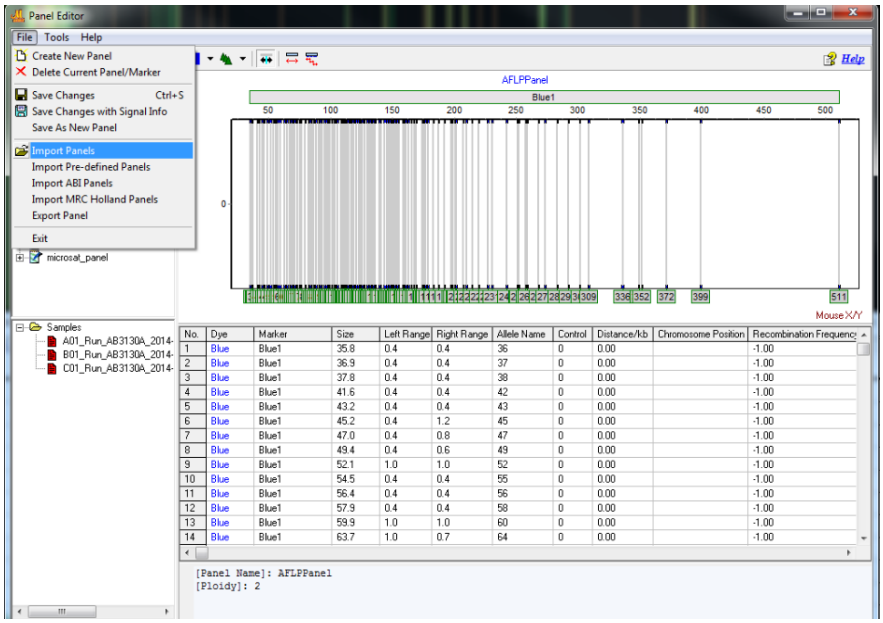
1. Den „**Panel Editor** “ im Dropdownmenü „Tools“ (Werkzeuge) öffnen (Abbildung 13).

Abbildung 13: Panel Editor auswählen



2. Die Option „Import Panels“ (Panels importieren) im Dropdownmenü „File“ (Datei) auswählen (Abbildung 14).

Abbildung 14: Panels importieren


Panel Editor
File Tools Help
Create New Panel
Delete Current Panel/Marker
Save Changes Ctrl+S
Save Changes with Signal Info
Save As New Panel
Import Panels
Import Pre-defined Panels
Import ABI Panels
Import MRC Holland Panels
Export Panel
Exit
microsat_panel
Samples
A01_Run_AB3130A_2014-
B01_Run_AB3130A_2014-
C01_Run_AB3130A_2014-
Help
AFLPPanel
Blue1
50 100 150 200 250 300 350 400 450 500
MouseX/Y
No. Dye Marker Size Left Range Right Range Allele Name Control Distance/kb Chromosome Position Recombination Frequency
1 Blue Blue1 35.8 0.4 0.4 36 0 0.00 -1.00
2 Blue Blue1 36.9 0.4 0.4 37 0 0.00 -1.00
3 Blue Blue1 37.8 0.4 0.4 38 0 0.00 -1.00
4 Blue Blue1 41.6 0.4 0.4 42 0 0.00 -1.00
5 Blue Blue1 43.2 0.4 0.4 43 0 0.00 -1.00
6 Blue Blue1 45.2 0.4 1.2 45 0 0.00 -1.00
7 Blue Blue1 47.0 0.4 0.8 47 0 0.00 -1.00
8 Blue Blue1 49.4 0.4 0.6 49 0 0.00 -1.00
9 Blue Blue1 52.1 1.0 1.0 52 0 0.00 -1.00
10 Blue Blue1 54.5 0.4 0.4 55 0 0.00 -1.00
11 Blue Blue1 56.4 0.4 0.4 56 0 0.00 -1.00
12 Blue Blue1 57.9 0.4 0.4 58 0 0.00 -1.00
13 Blue Blue1 59.9 1.0 1.0 60 0 0.00 -1.00
14 Blue Blue1 63.7 1.0 0.7 64 0 0.00 -1.00
[Panel Name]: AFLPPanel
[Ploidy]: 2

3. Zum Panel GeneMarker MFI.xml oder GeneMarker Y-plus navigieren und importieren.
4. Den Vorgang nach Bedarf für andere relevante Paneldateien wiederholen.

Verarbeitung von Daten

Sobald die Rohdatendateien in den GeneMarker hochgeladen sind, können sie verarbeitet werden. Zu den Verarbeitungsschritten gehören die Anwendung eines Größenstandards, die Filterung von Rauschpeaks und bei Bedarf der Vergleich mit einem bekannten Allel-Panel.

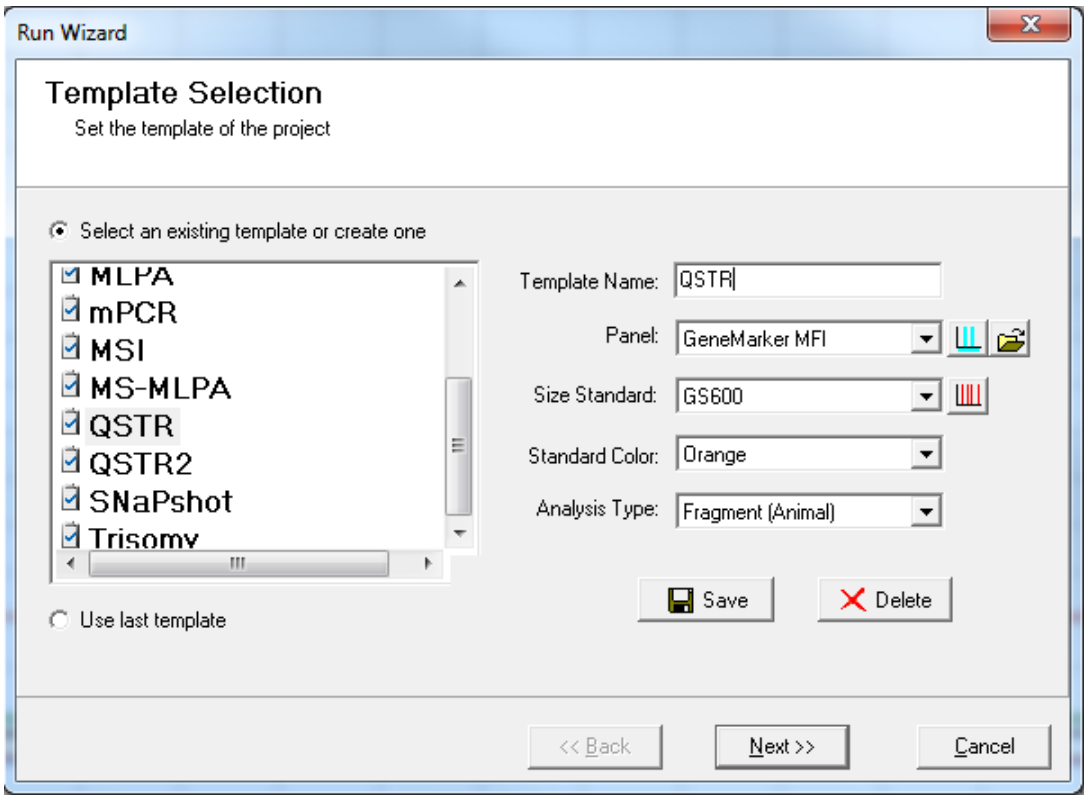
GeneMarker kombiniert all diese Schritte in einem einfachen Werkzeug namens „**Run Wizard**“ (Durchlauf-Assistent) (Abbildung 15). Der Durchlauf-Assistent wird einfach durch Klicken auf das Symbol „Run Project“ (Projekt ausführen) in der Hauptsymbolleiste aufgerufen

Durchlauf-Assistent – Eine Durchlaufvorlage erstellen

Bei der ersten Verwendung dieser Software zur Analyse von Male Factor Infertility-Produkt-Daten muss eine Durchlaufvorlage erstellt werden. Dazu dient der Durchlauf-Assistent.

1. Der Durchlauf-Assistent wird einfach durch Klicken auf das Symbol „**Run Project**“ (Projekt ausführen) in der Hauptsymbolleiste aufgerufen.
2. Eine Bezeichnung für die Vorlage bestimmen, z. B. **QSTR.**
3. Wie in der nachstehenden Abbildung 15 dargestellt „Panel“, „Size Standard“ (Größenstandard), „Standard Colour“ (Standardfarbe) und „Analysis Type“ (Analyseart) auswählen.
4. Auf „Save“ (Speichern) klicken, um die Vorlage für künftige Analysen zu speichern.
5. Zum Fortfahren auf „Next“ (Weiter) klicken.

Abbildung 15: Run Wizard (Durchlauf-Assistent) – Fenster „Template Selection“ (Vorlagenauswahl)



Run Wizard (Durchlauf-Assistent) – Data Process (Datenverarbeitung)

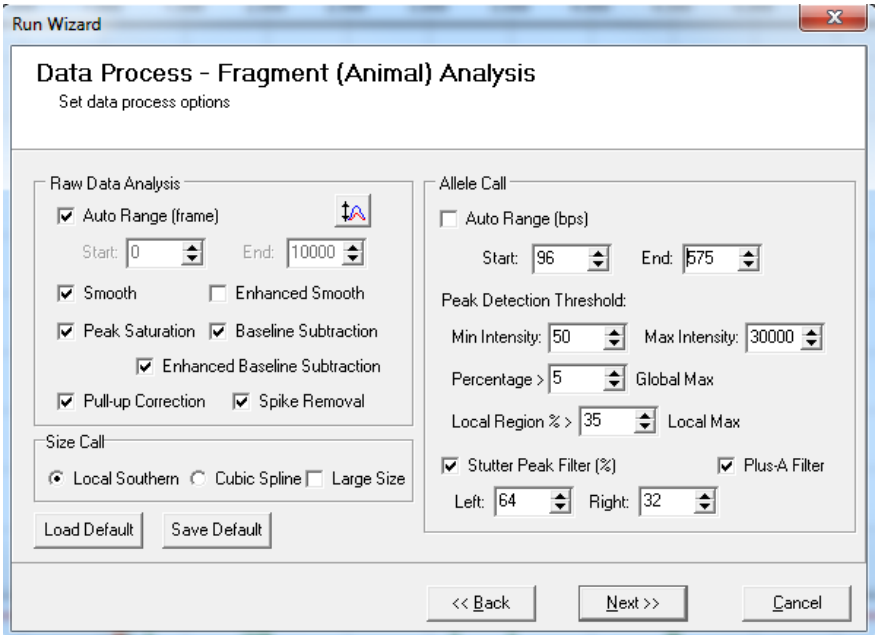
Im Fenster „Data Process“ (Datenverarbeitung) des Durchlauf-Assistenten kann der Anwender die Peakfilterparameter auswählen.

1. Wie in der nachstehenden Abbildung dargestellt im Fenster „Data Process“ (Datenverarbeitung) die geeigneten Analyseeinstellungen auswählen (Abbildung 16).

2. Zum Fortfahren auf „Next“ (Weiter) klicken.

Hinweis: *Die Einstellung des Analysebereichs im Feld „Raw Data Analysis“ (Rohdatenanalyse) hängt davon ab, welches Polymer während der Datenerhebung verwendet wird. Der Anwender sollte einen Wert für den Start-Datenpunkt auswählen, der den Standardpeak der Größe 60 bp mit einschließt*.

Abbildung 16: Fenster Run Wizard (Durchlauf-Assistent) – Data Process (Datenverarbeitung)



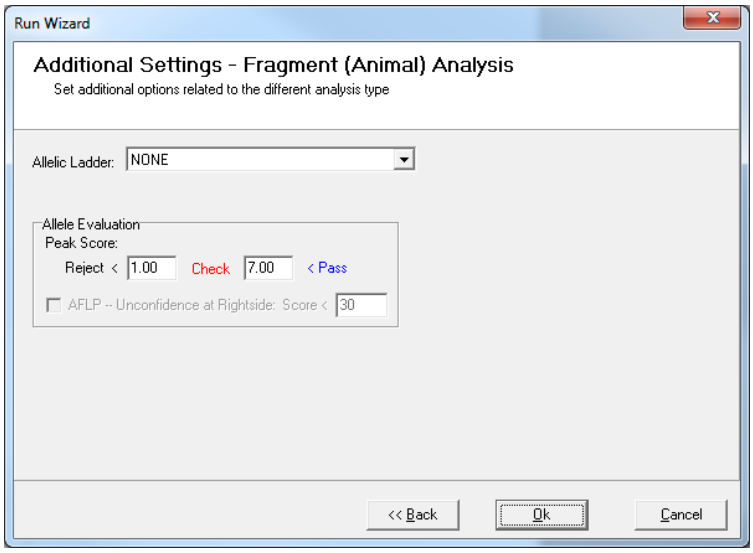
Hinweis*: Für 3500-Daten „Min Intensity“ (Mindestintensität) auf 150 erhöhen.*

Run Wizard (Durchlauf-Assistent) –„Additional Settings“ (Weitere Einstellungen)

Es sind keine weiteren Einstellungen erforderlich (Abbildung 17).

1. Zum Fortfahren auf „OK“ klicken.

Abbildung 17: Run Wizard (Durchlauf-Assistent) –„Additional Settings“ (Weitere Einstellungen)

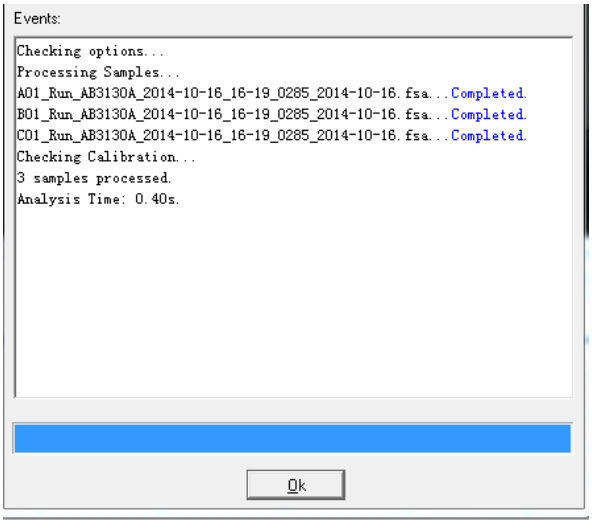


Feld „Data Processing“ (Datenverarbeitung)

Nach Klicken auf „OK“ im Feld „Additional Settings“ (Weitere Einstellungen) des Durchlauf-Assistenten öffnet sich das Feld „Data Processing“ (Datenverarbeitung) (Abbildung 18). Die Rohdaten werden verarbeitet und vermessen, woraufhin die Filterparameter und das ausgewählte Panel angewendet werden.

1. Nach Abschluss der Analyse im Feld „Data Processing“ (Datenverarbeitung) auf „OK“ klicken.

Abbildung 18: Feld „Data Processing“ (Datenverarbeitung)



Hauptanalysefenster

Das Hauptanalysefenster (Abbildung 19) von GeneMarker hat ein anwenderfreundliches Layout. Dieses Layout umfasst:

- Die Liste der Probendateien – links im Fenster angezeigt
- Das synthetische Gelbild – oben im Fenster angezeigt
- Datenelektropherogramme – unter dem Gelbild
- Eine Berichttabelle – rechts im Fenster angezeigt

In diesem Fenster muss unbedingt geprüft werden, ob alle Peaks in den einzelnen Profilen jeweils die korrekte Beschriftung tragen.

1. Nacheinander auf jede Probe in der Probendateistruktur links auf dem Bildschirm doppelklicken. Mit der rechten Maustaste auf alle fraglichen Peaks klicken und aus den Optionen im Dialogfeld nach Bedarf z. B. Allel bearbeiten oder löschen, bestätigen oder Bestätigung aufheben auswählen

2. Im Hauptanalysefenster das Dropdownmenü „Applications“ (Anwendungen) oben auf dem Bildschirm auswählen. „**Trisomy Analysis**“ (Trisomie-Analyse) auswählen. Daraufhin öffnet sich das Feld „Trisomy Analysis Settings“ (Einstellungen für die Trisomie-Analyse) (Abbildung 20).

Abbildung 19: Hauptanalysefenster

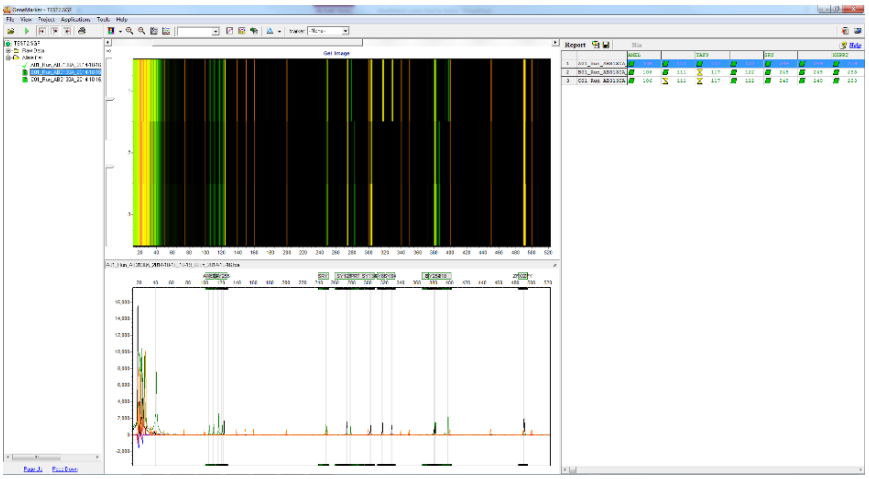
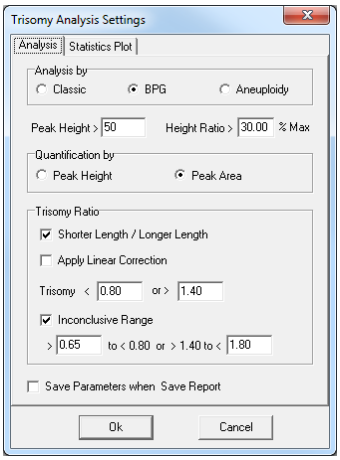


Abbildung 20: Feld „Trisomy Analysis Settings“ (Einstellungen für die Trisomie-Analyse)



Hinweis: *Für 3500-Daten „Minimum Intensity“ (Mindestintensität) auf 150 erhöhen.*

Einstellungen für die Trisomie-Analyse

Im Feld „Trisomy Analysis Settings“ (Einstellungen für die Trisomie-Analyse) stehen zwei Registerkarten zur Verfügung:

1. Registerkarte „Analysis“ (Analyse)

2. Registerkarte „Statistics Plot“ (Statistikdiagramm)

Registerkarte „Analysis“ (Analyse)

In der Registerkarte „Analysis“ (Analyse) können Schwellwertoptionen für die Trisomie-Analyse gewählt werden. Sicherstellen, dass im Feld „Analysis“ (Analyse) die Option „BPG “ ausgewählt ist und die folgenden Einstellungen angezeigt werden:

- „Peak Height“ (Peakhöhe) von 50: Mindesthöhe von 50 für die Auszeichnung von Peaks. (150 bei Verwendung von 3500-Daten)
- „Height Ratio“ (Höhenverhältnis) von 30 %: Maximalhöhe des zweiten Peaks im Verhältnis zum Hauptpeak (in Prozent), damit zwei Allele identifiziert werden.
- „Quantification by Peak Area“ (Quantifizierung nach Peakfläche)
- „Shorter Length/Longer Length“ (Kürzer/Länger) ausgewählt
- Die Verhältnis-Schwellwerte für Trisomie sind 0,80 bis 1,40.
- „Apply Linear Correction“ (Lineare Korrektur anwenden) nicht ausgewählt
- Auf „OK“ klicken.

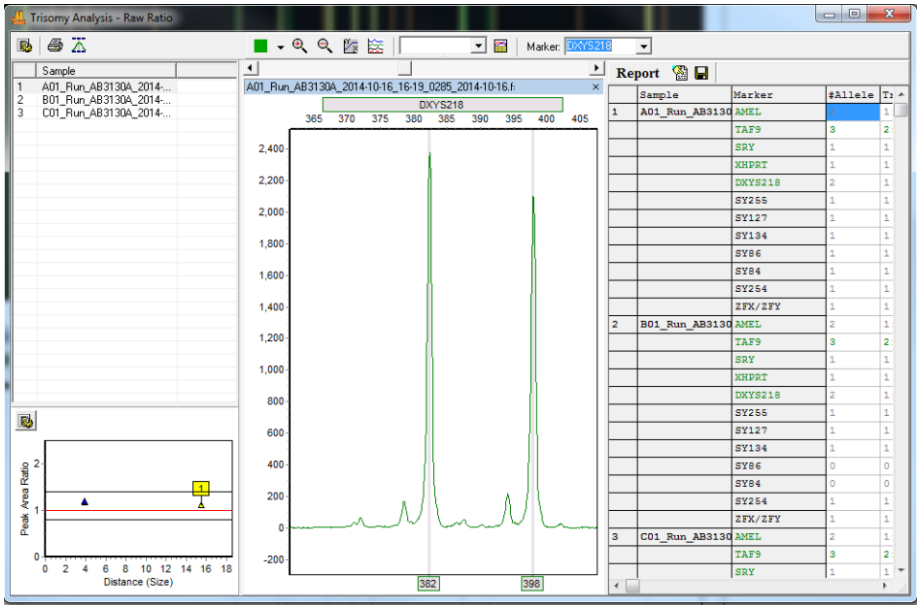
Fenster „Trisomy Analysis“ (Trisomie-Analyse)

Im Fenster „Trisomy Analysis“ (Trisomie-Analyse) (Abbildung 21) kann sich der Anwender Aneuploidie-Probendaten
und das Peak-Verhältnis für jeden Marker anzeigen lassen sowie auf den GeneMarker-Bericht zugreifen.
Eine Reihe von Anzeigen unterstützen den Anwender bei der Datenanalyse. Diese sind:

- Probenliste
- Elektropherogramm
- Verhältnisdiagramm
- Berichttabelle

Bitte beachten, dass eine Trisomie-Analyse bei Daten zu Mikrodeletionen des Y-Chromosoms nicht notwendig ist.

Abbildung 21: Fenster „Trisomy Analysis“ (Trisomie-Analyse)



Einzelheiten zu den Funktionen der Trisomie-Analyse und ihrer Anwendung finden sich im Handbuch für GeneMarker.

GeneMarker-Bericht

GeneMarker enthält eine Berichtsvorlage, die mit dem Elucigene Male Factor Infertility-Kit kompatibel ist (diese Funktion wird bei der Analyse von Daten auf dem MFI-Yplus-Kit nicht benötigt). Um zum Bericht zu gelangen, das Symbol „Print“ (Drucken) in der Symbolleiste oben links im Fenster „Trisomy Analysis“ (Trisomie-Analyse) anklicken.

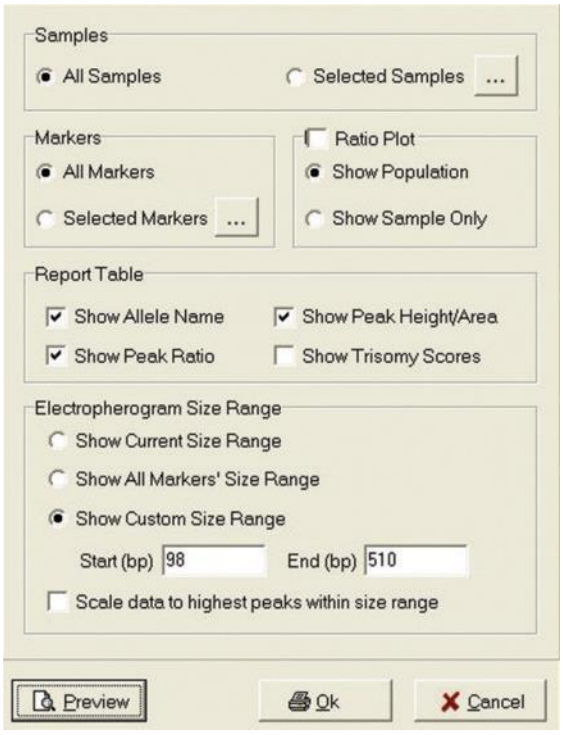
Daraufhin öffnet sich das Fenster „Trisomy Print Settings“ (Trisomie-Druckeinstellungen) (Abbildung 22).

Fenster „Trisomy Print Settings“ (Trisomie-Druckeinstellungen)

Die Trisomie-Druckeinstellungen legen die einzelnen Optionen fest, nach denen Daten im GeneMarker-Bericht aufgeführt und dargestellt werden.

Die in Abbildung 22 gezeigten Optionen auswählen. Sicherstellen, dass „Custom Size Range“ (Individueller Größenbereich) auf 98 bp (Start) und 600 bp (Ende) eingestellt ist.

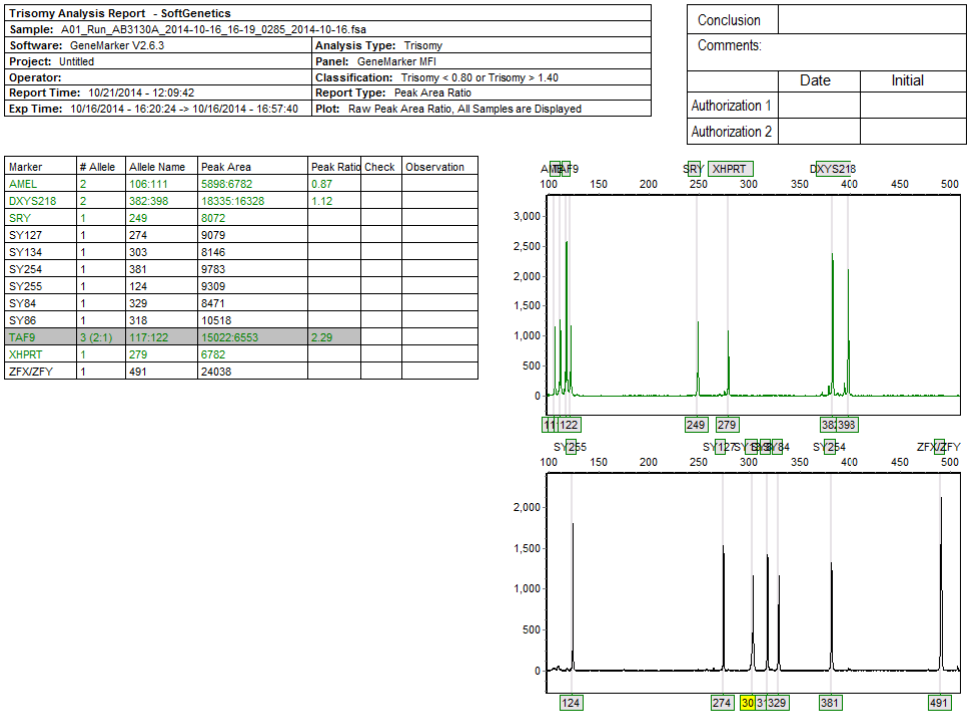
Abbildung 22: Fenster „Trisomy Print Settings“ (Trisomie-Druckeinstellungen)



Vorschau des GeneMarker-Berichts

Die Schaltfläche „Preview“ (Vorschau) anklicken, um sich den GeneMarker-Bericht anzeigen zu lassen (Abbildung 23). Von diesem Fenster aus kann der Anwender die Peakdaten für jede Probe über alle Marker hinweg betrachten und drucken, sodass ein einfacher, ein- bis zweiseitiger Probenbericht entsteht.

Abbildung 23: GeneMarker-Bericht



Trisomy Analysis Report - SoftGenetics	
Sample: A01_Run_AB3130A_2014-10-16_16-19_0285_2014-10-16.fsa	
Software: GeneMarker V2.6.3	**Analysis Type:** Trisomy
Project: Untitled	**Panel:** GeneMarker MFI
Operator:	**Classification:** Trisomy < 0.80 or Trisomy > 1.40
Report Time: 10/21/2014 - 12:09:42	**Report Type:** Peak Area Ratio
Exp Time: 10/16/2014 - 16:20:24 -> 10/16/2014 - 16:57:40	**Plot:** Raw Peak Area Ratio, All Samples are Displayed

Conclusion		
Comments:		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

Marker	# Allele	Allele Name	Peak Area	Peak Ratio	Check	Observation
AMEL	2	106:111	5898:6782	0.87		
DXYS218	2	382:398	18335:16328	1.12		
SRY	1	249	8072			
SY127	1	274	9079			
SY134	1	303	8146			
SY254	1	381	9783			
SY255	1	124	9309			
SY84	1	329	8471			
SY86	1	318	10518			
TAF9	3 (2:1)	117:122	15022:6553	2.29		
XHPRT	1	279	6782			
ZFX/ZFY	1	491	24038			

Der GeneMarker-Bericht enthält die folgenden Elemente

- Berichtüberschrift: Enthält Informationen zu Analyse, Projekt, Probe und Parameter.
- Signaturfeld: Platz für Datum und Initialen von Berichtprüfern.
- Elektropherogramm: Ähnlich wie beim Fenster „Trisomy Analysis“ (Trisomie-Analyse) werden alle Farbstofffarben der Probenspur angezeigt.
- Berichttabelle: Zeigt ausgewählte Peak-und Markerwerte für die aktuelle Probe an. Trisomie-Auszeichnungen sind grau hervorgehoben. Eine zusätzliche Prüfspalte ist für die Initialen des Prüfers vorgesehen.
- Korrigiertes Verhältnisdiagramm: Enthält die Diagrammpunkte des gesamten Datensatzes für alle Marker des jeweiligen Farbstoffs. Die Symbolformen stehen für verschiedene Marker; die zugehörige Legende ist in der Zeile „Symbol“ der „Report Table“ (Berichtstabelle) zu finden. Gelb ausgefüllte Symbole stehen für die Datenpunkte der aktuellen Probe. Symbole mit roter Umrandung stehen für Trisomie-Auszeichnungen.

Hinweis: *Das korrigierte Verhältnisdiagramm erscheint auf einer zweiten Seite für jede Probe, jedoch nur, wenn „Ratio Plot“ (Verhältnisdiagramm) im Feld „Trisomy Print Report Settings“ (Trisomiebericht-Druckeinstellungen) ausgewählt wurde.*

ANHANG 1: Beschriftung der Farbstoffe

Die Marker sind wie folge markiert:

Male Factor Infertility

NED	VIC
sY84	AMEL
sY86	TAF9L
sY127	SRY
sY134	XHPRT
sY254	DXYS218
sY255	
ZFX/ZFY	

MFI-Y*plus*

6-FAM
SY82
SY83
SY88
SY105
SY121
SY143
SY153
SY160
SY1182
SY1191
SY1291

ANHANG 2: - Tabelle mit Markerlage, beobachteter Heterozygotie, Allel-Größenbereich

Male Factor Infertility

Marker	Ort	Beobachtete Heterozygotie*	Bin-Bereich (bp)	Marker-Farbe
AMEL	Xp22.22/Yp11.2	n. zutr.	102,5/112,5	grün
TAF9	3p24.2/Xq21.1	n. zutr.	113/122,5	grün
SRY	Yp11.31	n. zutr.	240-252,5	grün
XHPRT	Xq26.2	0,72	260,5-304,5	grün
DXYS218	Xp22.32/Yp11.3	0,74	367,5-402,5	grün
SY84	Yq11.1 (221)	n. zutr.	323-333	gelb
SY86	Yq11.21 (221)	n. zutr.	312-322	gelb
SY127	Yq11.223	n. zutr.	267-277	gelb
SY134	Yq11.223	n. zutr.	297-308	gelb
SY254	Yq11.23 (223)	n. zutr.	375-386	gelb
SY255	Yq11.23 (223)	n. zutr.	118-128	gelb
ZFX/Y	Xp22.11/Yp11.2	n. zutr.	485-495	gelb

MFI-Y*plus*

Marker	Ort	Bin-Bereich (bp)	Marker-Farbe
SY82	Yq11.21	260-268	blau
SY83	Yq11.21	270-280	blau
SY88	Yq11.221	118-128	blau
SY105	Yq11.222	291-305	blau
SY121	Yq11.222	180-200	blau
SY143	Yq11.223	305,5-315	blau
SY153	Yq11.223-Yq11.23	134-144	blau
SY160	Yq12	231-241	blau
SY1182	Yq11.221	242-252	blau
SY1191	Yq11.223	375-395	blau
SY1291	Yq11.223	517-537	blau

***Die beobachteten Heterozygotien beruhen auf der mit dem Validierungspanel von Elucigene Diagnostics beobachteten Anzahl von Allelen. Diese Zahlen können daher von veröffentlichten Daten abweichen und auch je nach der getesteten Population schwanken.**

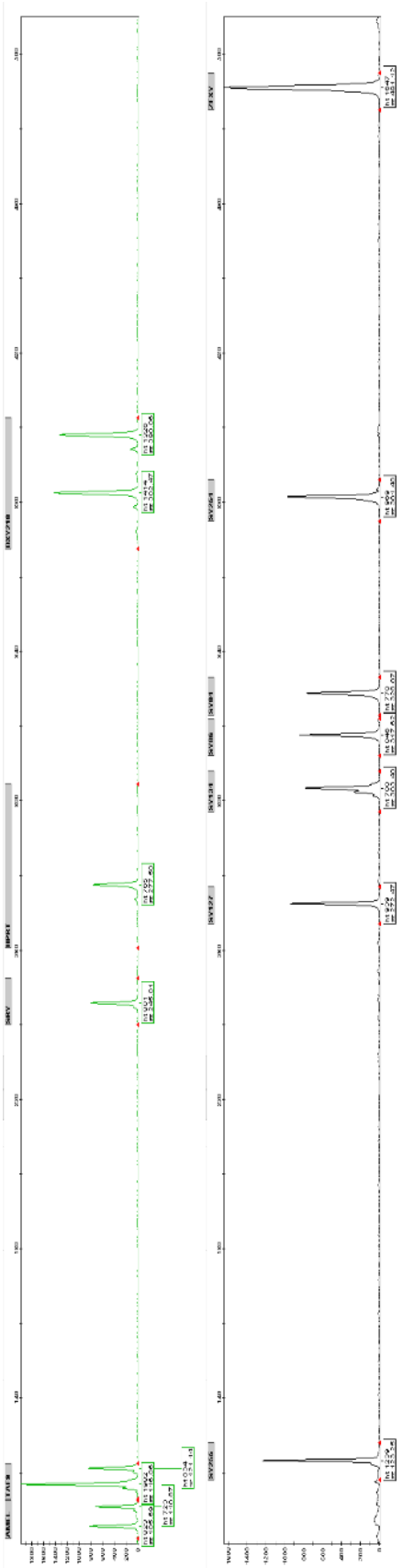
Lokation der in den Male Factor Infertility-Kits verwendeten STS-Marker für Mikrodeletionen des Y-Chromosoms

Region	STS-Marker	Beginn STS	Ende STS
AZFa	SY82		
AZFa	SY84		
AZFa	SY86		
AZFa	SY1182		
AZFa	SY88		
AZFb	SY105		
AZFb	SY121		
AZFb	SY127		
AZFb	SY134		
AZFb	SY143		
AZFc GR/GR	SY1191		
AZFb	SY153		
AZFc	SY254		
AZFc	SY254		
AZFc	SY254		
AZFc	SY254		
AZFc GR/GR	SY1291		
AZFb	SY153		
AZFc	SY254		
AZFc	SY254		
AZFc	SY254		
Terminal	SY160		

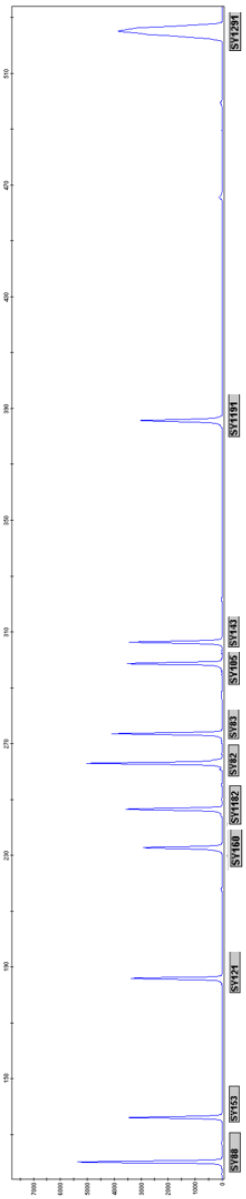
Die Genomkoordinaten wurden der Datenbank MSY Breakpoint Mapper (breakpointmapper.wi.mit.edu) basierend auf NCBI Build 38 entnommen.

Anhang 3: GeneMapper-Profil

Normales männliches GeneMappe-Profil, aus dem die relative Lage der mittels Male Factor Infertility nachgewiesenen Marker hervorgeht.



Normales männliches GeneMappe-Profil, aus dem die relative Lage der mittels MFI-Y*plus* nachgewiesenen Marker hervorgeht.



Leistungsmerkmale

Interne Validierung

24 DNA-Proben (aus Vollblut extrahiert) wurden mittels des Elucigene Male Factor Infertility-Kits verblindet untersucht. Bei 1 Probe kam es zum Versagen der Amplifikation, was mit einer geringen DNA-Konzentration und -Qualität korrelierte. Von den Proben, die interpretierbare Ergebnisse lieferten, waren 9 normal, wiesen 2 eine Mikrodeletion in der AZFa-Region und 6 Mikrodeletionen in der AZFc-Region auf und zeigten 6 größere Deletionen, die sowohl AZFb als auch AZFc (AZFbc) betrafen. Alle analysierbaren Ergebnisse wiesen eine Spezifizität und Sensitivität von 100 % im Vergleich zu den zuvor mit einer etablierten Alternativmethode erzielten Ergebnissen auf.

Die erweiterte Analyse mittels des Elucigene MFI-Y*plus*-Kits bestätige das Vorliegen dieser Y-Mikrodeletionen und ergab darüber hinaus den Nachweis einer Reihe von Subdeletionen, nämlich GR/GR-Deletionen (partiell in AZFc) in 2 Wildtypproben, eine partielle AZFa-Deletion in einer AZFbc-Probe sowie den Verlust des terminalen SY160-Markers in 5 AZFbc-Proben, was auf eine größere terminale Yq-Deletion hinweist.

Externe Validierung

25 Proben wurden mittels des Elucigene Male Factor Infertility-Kits an einer externen Prüfstelle untersucht. Bei 20 dieser Proben ergaben die Tests, dass es sich um männliche Proben handelte. Von diesen wurden 12 als Wildtyp für Mikrodeletionen des Y-Chromosoms getestet, 2 Proben wurden positiv für AZFa-Mikrodeletionen, 1 für AZFb-, 1 für AZFc-, 3 für AZFbc- und 1 für eine AZFabc-Mikrodeletion getestet. Alle Ergebnisse wiesen eine Spezifizität und Sensitivität von 100 % im Vergleich zu den zuvor mit einer etablierten Alternativmethode erzielten Ergebnissen auf.

Bei einer Probe schien ein Verlust des SY86-Peaks (Marker für die AZFa-Region) vorzuliegen, dafür wurden 2 Peaks des SY134-Marker (Marker für die AZFb-Region) nachgewiesen. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich Folge einer kleinen Deletion (ca. 19 bp) des SY86-Amplikons, was zu einer Migration dieses PCR-Produkts in die benachbarten SY134-Marker bei der Kapillarelektrophorese führt (ein Beispiel ist im entsprechenden Leitfaden zur Interpretation zu finden).

Grenzen des Verfahrens

Dieser Test ist darauf ausgelegt, wie in der Gebrauchsanweisung im Einzelnen dargelegt, bestimmte Geschlechtschromosom-Aneuploidien sowie spezielle Deletionen des Y-Chromosoms nachzuweisen. Er kann Neuordnungen der getesteten Chromosome u. U. nicht nachweisen und weist in keinem Fall Anomalien in anderen Chromosomen nach. Ein Mosaik der getesteten Chromosome kann eventuell nicht nachgewiesen werden.

Hinweis: *Die Heterozygotien der verwendeten Marker entstammen randomisierten Proben aus einer überwiegend nordeuropäischen, weißen Population, die zu Routineanalysen eingeschickt wurden. Etwaige Berechnungen anhand dieser Heterozygotien gelten streng genommen nur für die Population, in der die Proben entnommen wurden. Eventuell sollte im Rahmen einer Validierungsstudie eine kleine Studie anhand lokal beschaffter Proben durchgeführt werden, um die Heterozygotien in der zu testenden Population zu ermitteln. Es wird davon ausgegangen, dass die auf der Population beruhende Variation keine signifikanten Auswirkungen auf den Gesamtinformationsgehalt des Assays hat.*

Weitere Einzelheiten zu den Elucigene Produkten stehen unter der folgenden Adresse zur Verfügung:

http://www.elucigene.com

Literaturangaben

1. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Medical Journal 2009 Apr;50(4): 336-47
2. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tuttelmann F, European Academy of Andrology, European Molecular Genetics Quality Network. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. Andrology. 2014 Jan;2(1):5-19
3. Mansfield E S. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. Human Molecular Genetics 1993 2(1): 43-50
4. Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Yau SC, Scriven PN, Docherty Z, Mackie Ogilvie C. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. The Lancet 2001 358 (9287): 1057-1061
5. Mann K, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Mackie Ogilvie C. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. European Journal of Human Genetics 2004 12: 907-915
6. Mackie Ogilvie C, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Mann K. Rapid prenatal diagnosis of an aneuploidy using Quantitative Fluorescence-PCR (QF-PCR). Journal of Histochemistry and Cytochemistry 2005 53(3): 285-288
7. Deutsch S, Choudhury U, Merla G, Howald C, Sylvan A, Antonarakis SE. Detection of aneuploidies by paralogous sequence quantification. Journal of Medical Genetics 2004 41: 908-915
8. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. International Journal of Andrology 2004 27:240-9
9. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet 343:1509-1510 (1994).
10. PCR Primer: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe. ColdSpring Harbour Laboratory Press: Abschnitt 1

ELUCIGENE ist eine Marke von Delta Diagnostics (UK) Ltd.

QIAAMP ist eine Marke von Qiagen Gmbh. GENEMARKER ist eine Marke der Softgenetics Corporation. GENEMAPPER, GENESCAN, NED, VIC, PET, POP-7, LIZ und HI-DI sind Marken der Life Technologies Corporation.

Hinweise an den Käufer: Begrenzte Lizenz

Dieses Produkt wird im Rahmen eines Vertrags mit der Life Technologies Corporation vertrieben. Im Kaufpreis dieses Produkts sind nicht übertragbare Rechte enthalten, die die Anwendung nur des betroffenen Teils des Produkts und seiner Komponenten und ausschließlich zum Zweck der In-vitro-Diagnostik und der in der beiliegenden Gebrauchsanweisung beschriebenen klinischen Indikationen gestatten. Darüber hinaus werden keine weiteren Rechte gewährt. Weitere Informationen zum Erwerb von Lizenzen zur Anwendung dieses Produkts und seiner Komponenten erhalten Sie unter outlicensing@lifetech.com.

Copyright 2015 Delta Diagnostics (UK) Ltd.